



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0082502
(43) 공개일자 2015년07월15일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/54 (2006.01) *C11D 3/386* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 9/54 (2013.01)
C11D 3/386 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7014866
- (22) 출원일자(국제) 2013년11월05일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2015년06월04일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2013/068590
- (87) 국제공개번호 WO 2014/071410
국제공개일자 2014년05월08일
- (30) 우선권주장
61/722,660 2012년11월05일 미국(US)
- (71) 출원인
다니스코 유에스 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94304) 팔로 알토
페이지 밀 로드 925
- (72) 발명자
알렉세예프 빅토르 유리에비치
미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로
드 925 다니스코 유에스 인크.
베이브 릴리아 마리아
미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로
드 925 다니스코 유에스 인크.
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인코리아나

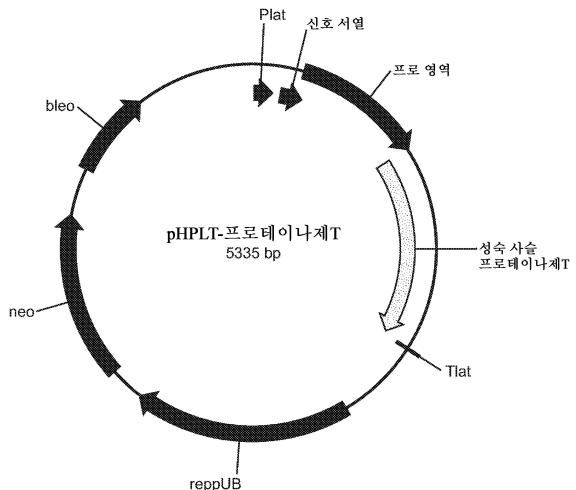
전체 청구항 수 : 총 54 항

(54) 발명의 명칭 썬더리신 프로테아제 변이체를 포함하는 조성물 및 방법

(57) 요약

본 발명은 생성되는 세린 프로테아제 - 썬더리신- 변이체를 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 참고 세린 프로테아제와 비교하여 하나 이상의 치환을 갖는 세린 프로테아제 변이체를 제공한다. 또한, 본 발명은 이러한 세린 프로테아제 변이체를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명은 이러한 세린 프로테아제 변이체들 중 적어도 하나를 포함하는 세정 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Y 304/24027 (2013.01)

(72) 발명자

에스텔 테이비드 에이

미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로드 925 다니스코 유에스 인크.

괴테게부르 프리츠

미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로드 925 다니스코 유에스 인크.

멀더 함

미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로드 925 다니스코 유에스 인크.

토레스 파즈미노 다니엘 에스테반

미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로드 925 다니스코 유에스 인크.

야오 지안

미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로드 925 다니스코 유에스 인크.

보트 리차드 알

미국 94304 캘리포니아주 팔로 알토 페이지 밀 로드 925 다니스코 유에스 인크.

명세서

청구범위

청구항 1

모(parent) 써몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 상기 변형은 상기 써몰리신 효소 변이체의 생산 위치(productive position)에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 75% 이상은 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

- a) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성(microswatch cleaning), Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (performance index, PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;
- b) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;
- c) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서, 상기 생산 위치는 2, 87, 96, 198, 277, 293, 295, 298 및 301로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 써몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 생산 위치는 2 (T,F,L,P,S,V,W,Y,Q,A,C,I,K,M), 87 (V,D,E,G,I,S,P,R,T,C,K,L,M,N,Q,W,Y), 96 (N,C,D,I,V,F,T,G,H,Q,R,S,W,K,L,Y), 198 (S,C,E,F,G,H,I,P,Q,T,V,M,N,R,W,A,K), 277 (P,Q,S,T,E,F,G,H,N,R,V,W,A,D,Y), 293 (T,C,E,F,G,H,Q,S,N,V,W,A,I,K,L,M,Y), 295 (L,C,I,N,T,V,F,G,A,K,M,W), 298 (S,C,T,W,Y,E,N,P,A,G,K,M,R), 301 (Q,E,H,P,R,L,C,F,G,W,M,S,T,V,K)로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 써몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨지는, 변이체.

청구항 3

모 써몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 상기 변형은 생산 위치에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들은 하기 기준을 만족하는, 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

발현, 세제 안정성, 열 안정성, PAS-38 마이크로스와치 세정 활성, 또는 Abz-AGLA-Nba에 대한 활성의 파라미터들 중 적어도 3개에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 1 이상인 위치;

여기서, 상기 생산 위치는 278, 283, 180, 244, 48 및 63으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 써몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 생산 위치는 T278R, Q283E, A180E, I244T, T48E 및 F63C로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 써몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨지는, 변이체.

청구항 5

모 써몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 상기 변형은 생산 위치에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 적어도 하나의 변형은 하기 기준을 만족하는,

써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

발현, 세제 안정성, 열 안정성, PAS-38 마이크로스와치 세정 활성, 또는 Abz-AGLA-Nba에 대한 활성의 파라미터들 중 적어도 전부에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.5 이상이고 상기 파라미터들 중 하나 이하에 대해 0.8 미만인 위치;

여기서, 상기 생산 위치는 019, 025, 026, 063, 091, 096, 097, 101, 109, 118, 131, 140, 158, 159, 175, 180, 219, 225, 232, 244, 246, 261, 277, 293, 300, 301, 301, 303, 305, 및 311로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 써몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 생산 위치는 N019D, S025A, T026R, S065A, L091M, N096Q, N096R, N096Y, N097K, R101M, G109A, S118A, I131L, V140D, Q158A, N159E, N159K, L175V, A180R, G196T, G196Y, K219S, Q225E, I232R, I244L, Q246D, D261N, P277G, T293Y, S300G, Q301F, Q301M, V303R, S305A, D311A로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 써몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨지는, 변이체.

청구항 7

모 써몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 상기 변형은 상기 써몰리신 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 75% 이상은 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

- a) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;
- b) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;
- c) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서, 상기 생산 위치는 2, 26, 47, 49, 53, 65, 87, 91, 96, 108, 118, 128, 154, 179, 196, 197, 198, 199, 209, 211, 217, 219, 225, 232, 256, 257, 259, 261, 265, 267, 272, 276, 277, 286, 289, 290, 293, 295, 298, 299, 300, 301, 303, 305, 308, 311, 및 316로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 써몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 8

모 써몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 상기 변형은 상기 써몰리신 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 75% 이상은 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

- a) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;
- b) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;
- c) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나

에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서, 상기 생산 위치는 2, 26, 47, 53, 87, 91, 96, 108, 118, 154, 179, 197, 198, 199, 209, 211, 217, 219, 225, 232, 256, 257, 259, 261, 265, 267, 272, 276, 277, 286, 289, 290, 293, 295, 298, 299, 300, 301, 303, 305, 308, 311, 및 316으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 씨몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 씨몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 9

모 씨몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 씨몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 상기 변형은 상기 씨몰리신 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 40% 이상 75% 미만은 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 씨몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

a) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 씨몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;

b) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 씨몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;

c) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 씨몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서, 상기 생산 위치는 1, 4, 17, 25, 40, 45, 56, 58, 61, 74, 86, 97, 101, 109, 149, 150, 158, 159, 172, 181, 214, 216, 218, 221, 222, 224, 250, 253, 254, 258, 263, 264, 266, 268, 271, 273, 275, 278, 279, 280, 282, 283, 287, 288, 291, 297, 302, 304, 307, 및 312로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 씨몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 씨몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 10

제3항에 있어서, 모 씨몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 추가로 포함하며, 상기 변형은 상기 씨몰리신 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 40% 이상 75% 미만은 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 씨몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

a) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 씨몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;

b) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 씨몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;

c) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 씨몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서, 상기 생산 위치는 1, 4, 17, 25, 40, 45, 61, 74, 86, 97, 101, 109, 149, 150, 158, 159, 172, 181, 214, 216, 218, 221, 222, 224, 250, 253, 254, 258, 263, 264, 266, 268, 271, 275, 279, 282, 283, 287, 288, 291, 297, 302, 304, 307, 및 312로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 씨몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 씨몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 11

모 씨몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 씨몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 상기 변형은 상기 씨몰리신 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 15% 이상 40% 미만은 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 씨몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

- a) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;
- b) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;
- c) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서, 상기 생산 위치는 5, 9, 11, 19, 27, 31, 33, 37, 46, 64, 73, 76, 79, 80, 85, 89, 95, 98, 99, 107, 127, 129, 131, 137, 141, 145, 148, 151, 152, 155, 156, 160, 161, 164, 168, 171, 176, 180, 182, 187, 188, 205, 206, 207, 210, 212, 213, 220, 227, 234, 235, 236, 237, 242, 244, 246, 248, 249, 252, 255, 270, 274, 284, 294, 296, 306, 309, 310, 313, 314, 및 315로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 써몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 12

제5항에 있어서, 모 써몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 추가로 포함하며, 상기 변형은 상기 써몰리신 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 15% 이상 40% 미만은 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

- a) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;
- b) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;
- c) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서, 상기 생산 위치는 5, 9, 11, 19, 27, 31, 33, 37, 46, 64, 73, 76, 79, 80, 85, 89, 95, 98, 99, 107, 127, 129, 131, 137, 141, 145, 148, 151, 152, 155, 160, 161, 164, 168, 171, 176, 180, 182, 187, 188, 205, 206, 207, 210, 212, 213, 220, 227, 234, 235, 236, 237, 242, 244, 246, 248, 249, 252, 255, 270, 274, 284, 294, 296, 306, 309, 310, 313, 314, 및 315로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 써몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 13

모 써몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 상기 변형은 상기 써몰리신 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 하나 이상의 변형이지만 15% 미만은 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

- a) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;
- b) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;
- c) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서, 상기 생산 위치는 3, 6, 7, 20, 23, 24, 44, 48, 50, 57, 63, 72, 75, 81, 92, 93, 94, 100, 102, 103, 104, 110, 117, 120, 134, 135, 136, 140, 144, 153, 173, 174, 175, 178, 183, 185, 189, 193, 201, 223, 230, 238, 239, 241, 247, 251, 260, 262, 269, 및 285로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 씨몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 씨몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 14

제7항에 있어서, 모 씨몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 추가로 포함하며, 상기 변형은 상기 씨몰리신 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 하나 이상의 변형이지만 15% 미만은 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 씨몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

a) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 씨몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;

b) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 씨몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;

c) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 씨몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서, 상기 생산 위치는 3, 7, 20, 23, 24, 44, 48, 50, 57, 72, 81, 92, 93, 94, 100, 102, 103, 104, 110, 117, 120, 134, 135, 136, 140, 144, 153, 173, 174, 175, 178, 183, 185, 189, 193, 201, 223, 230, 238, 239, 241, 247, 251, 260, 262, 269, 및 285로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 씨몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 씨몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 15

모 씨몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 씨몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 상기 변형은 상기 씨몰리신 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 75% 이상은 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 씨몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

a) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 씨몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;

b) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 씨몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;

c) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 씨몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서, 상기 변형은 2 (T,F,L,P,S,V,W,Y,Q,A,C,I,K,M), 26 (T,K,L,R,V,Y,W,F,G,H,I,M,C,D), 47 (R,A,C,H,K,N,D,E,G,L,M,Q,T), 49 (T,A,F,H, V,E,Y), 53 (S,F,H,I,M,Q,T,W,K,R,A,N,V,C,L), 65 (S,I,M,Q,L,A), 87 (V,D,E,G,I,S,P,R,T,C,K,L,M,N,Q,W,Y), 91 (L,D,E,F,K,M,P,Q,S,A,N,R,W,Y), 96 (N,C,D,I,V,F,T,G,H,Q,R,S,W,K,L,Y), 108 (Q,C,E,F,H,A,D,I,K,N,L,M), 118 (S,C,G,E,A,D,M,Q,R,T,V), 128 (Q,D,E,R,S,K,A), 154 (G,L,Q,S,T,D,I,W,C,N,A,H,K,M,Y), 179 (Y,A,D,H,M,N,Q,S,T,W,F), 196 (G,E,T,K,V,L,Y,A,W), 197 (I,D,K,L,T,V,W,Y,A,H,N,E,Q,R,F,C), 198 (S,C,E,F,G,H,I,P,Q,T,V,M,N,R,W,A,K), 199 (G,C,E,F,H,Q,S,T,W,L,A,Y), 209 (A,D,E,L,S,T,V,G,I,K,P,R,Y,C,M), 211 (Y,A,C,D,F,G,H,I,L,N,Q,S,T,E,R), 217 (Y,Q,S,T,V,W,G,A,F,M,N,C,L), 219 (K,D,F,G,H,I,M,N,Q,T,A,E,R,S), 225 (Q,D,G,H,I,P,V,W,A,M,R,C,E,K,L,S), 232 (I,C,E,F,K,M,N,Q,W,G,L,R,S,T,V,Y), 256 (V,L,T,K,A,D,F,G,H,R,S,N), 257 (G,C,D,E,L,N,P,Q,S,T,Y,K,R), 259 (G,A,C,E,F,H,L,M,W,K,R,N,S,T), 261

(D,A,N,P,V,W,G,H,I,S), 265 (K,A,C,D,M,P,Q,S,G,I,L,R,N), 267 (F,E,G,N,S,V,W,A,C,H,I,K,L,M,T,Y), 272 (T,E,L,V,W,P,Y,C,F,N,Q,A,K), 276 (T,C,F,I,P,Q,W,H,A,L,V,Y), 277 (P,Q,S,T,E,F,G,H,N,R,V,W,A,D,Y), 286 (A,D,E,F,G,H,I,S,P,C,Q,R,T,K,L,M,N,Y), 289 (V,C,E,F,G,I,N,S,W,R,T,L,M,Y,A), 290 (Q,C,D,F,G,L,W,Y,R,T,V,A,H,N), 293 (T,C,E,F,G,H,Q,S,N,V,W,A,I,K,L,M,Y), 295 (L,C,I,N,T,V,F,G,A,K,M,W), 298 (S,C,T,W,Y,E,N,P,A,G,K,M,R), 299 (T,C,F,L,M,R,W,P,D,Q,N,A,K), 300 (S,C,K,M,R,Y,I,L,H,P,V,W,A,G,T,D,N), 301 (Q,E,H,P,R,L,C,F,G,W,M,S,T,V,K), 303 (V,C,H,G,K,L,R,W,A,P,Y), 305 (S,G,I,L,N,W,Y,Q,H,T,V,A,K,M), 308 (Q,C,D,F,G,I,M,R,V,W,Y,A,L), 311 (D,C,E,F,G,I,Q,S,T,A,K,L,M,V,W,Y), 및 316 (K,D,E,F,G,H,L,N,P,Q,R,S,V,W,Y,A,M)으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 써몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 16

모 써몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 상기 변형은 상기 써몰리신 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 40% 이상 75% 미만은 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

- a) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;
- b) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;
- c) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서, 상기 변형은 1 (I,K,M,V,A,H,W,Y,C,L), 4 (T,E,A,N,R,V,K,L,M,Y), 17 (Q,I,W,Y,C,R,V,T,L), 25 (S,D,F,A,C,K,M,R), 40 (F,E,G,M,Q,S,Y,W,A,K,L), 45 (K,E,L,S,F,H,Q,Y,A,G,M), 56 (A,K,Q,V,W,H,I,M), 58 (A,N,Y,V,L), 61 (Q,M,R,W,F,V,C,I,L), 74 (H,E,L,V,C,F,M,N,Q,W), 86 (N,L,S,Y,A,C,E,F,G,K,D), 97 (N,K,C,R,S,Y,E,M), 101 (R,T,C,L,S,H), 109 (G,A,L,S,E,M,R,W), 149 (T,M,V,A,L,D,S,N), 150 (D,A,F,K,N,Q,T,V,S), 158 (Q,A,K,M,N,L,R,Y,S), 159 (N,R,W,A,C,G,M,T,S,Y), 172 (F,G,L,M,Q,S,V,W,Y,D,H), 181 (N,L,A,G,K,M,T,S), 214 (P,C,G,K,S,N,A,R), 216 (H,C,E,S,T,R,A), 218 (S,K,L,Y,F,G,T,V), 221 (Y,K,N,Q,R,S,T,V,A,F,G,M), 222 (T,C,D,L,Y,I,V,A,M,K), 224 (T,K,M,F,L,P,Q,V,Y,E,H), 250 (H,A,C,K,M,N,P,Q,R,V,Y), 253 (V,N,T,I,R,Y,M,Q), 254 (S,A,M,R,Y,K,L,N,V,W), 258 (I,E,L,M,N,R,S,A,C,K,Q,V), 263 (L,C,I,Q,T,H,K,N,V,A,M), 264 (G,C,R,A,N,P,Q,S,T), 266 (I,A,F,L,S,C,M,T,V), 268 (Y,M,Q,V,A,S,K), 271 (L,A,D,F,I,N,Y,H), 273 (Q,A,H,Y,C,S,W,E,G,N), 275 (L,I,M,V,C,Q,S,T), 278 (T,G,K,R,Y,C,H,M,N,Q,S), 279 (S,A,D,I,L,M,N,Q,T,G), 280 (N,A,C,D,E,G,Q,H,T), 282 (S,K,N,R,A,H,L,M,T), 283 (Q,K,L,P,R,W,Y,S), 287 (A,I,L,N,V,Y,K,R,T,D,C), 288 (A,C,I,S,T,V,Y,N,L,M), 291 (S,E,I,L,M,N,V,A,T), 297 (G,A,M,R,Y,C,F,K,T,D,N), 302 (E,K,L,G,T,V,D,Q,A), 304 (A,C,D,L,N,R,S,T,W,E,K,Y), 307 (K,A,C,G,I,M,N,Q,R,W,Y,H), 및 312 (A,G,M,V,L,N,R,T,C)로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 써몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 17

모 써몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 상기 변형은 상기 써몰리신 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 15% 이상 40% 미만은 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

- a) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;

b) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;

c) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서, 상기 변형은 5 (S,D,N,P,H,L), 9 (V,L,T,I), 11 (R,I,Y,K), 19 (N,L,Y,K,S), 27 (Y,W,A,M,V,C,L), 31 (Q,A,K,V,I,C,Y), 33 (N,S,T,K,A,C,L,M), 37 (N,D,Q,R,L,K), 46 (Y,L,H,N,C), 64 (A,H,Q,T,D,E), 73 (A,I,F,L,M,W), 76 (Y,H,L,M,Q,T), 79 (V,L,Q,T,A,N,S), 80 (T,I,D,A,L,N), 85 (K,E,A,L,N,R,S), 89 (N,L,M,H), 95 (G,A,D,H,M,N,S), 98 (A,C,E,H,R,Y,K,V), 99 (A,E,K,P,R,S), 107 (S,D,K,Y,A,G), 127 (G,C,D,E), 129 (T,I,R,E,Y,L,M), 131 (I,Y,W,L), 137 (I,P,A,E,T,V,L), 141 (A,S,C,G), 145 (T,A,C,E,G,M,N,Q), 148 (V,L,N,Y,M,A,Q), 151 (Y,G), 152 (T,S,L,M,G), 155 (L,C,I,M), 156 (I,L,Q), 160 (E,L,Y,Q), 161 (S,A,N,P,T), 164 (I,L,N,S,T,V,C,A), 168 (I,A,M,T,L), 171 (I,C,E,F,L,S,G), 176 (V,L,N,C), 180 (A,E,G,K,T,S), 182 (K,L,A,W), 187 (E,L,D), 188 (I,L,V), 205 (M,L,A,V,Q), 206 (S,A,C,K,L,M,R), 207 (D,A,H,N), 210 (K,I,L,V), 212 (G,Y,A,D,Q), 213 (D,N,S,L,A,G,W), 220 (R,K,V,A), 227 (N,D,L,Y,A), 234 (S,D,N,A,C), 235 (G,M,C,Q,S,A), 236 (I,M,A,C), 237 (I,N,F,M), 242 (Y,C,F,N,V), 244 (I,T,V,F,A,M,L), 246 (Q,E,N,T,L,C,D), 248 (G,A,E,S), 249 (T,K,M,N,L,Y,P), 252 (G,K,Y,A,S,T,W), 255 (V,L,P,A,Y,M,N), 270 (A,C,F,I,L,S,G), 274 (Y,F,H,A,C,Q,T,M), 284 (L,V,W,A,M,Y), 294 (D,A,V,Q,N), 296 (Y,N,L,R,H,W,M), 306 (V,A,S,F,I,L,T), 309 (A,G,S,T,V,C), 310 (F,A,C,W,M), 313 (V,T,A,G,L,I,C), 314 (G,A,E,H,M,S,W,Q), 및 315 (V,A,C,I,M,L,T)로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 써몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 18

모 써몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 상기 변형은 상기 써몰리신 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 하나 이상의 변형이지만 15% 미만은 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하는, 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

a) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;

b) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치;

c) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치;

여기서, 상기 변형은 3 (G,Y), 6 (T,C,V), 7 (V,L,I), 20 (I,L,V), 23 (T,F,W), 24 (Y,W), 44 (A,C), 48 (T,E,D), 50 (L,P), 57 (D,K), 63 (F,Y,C), 72 (D,F,W), 75 (Y,A), 81 (Y,F), 92 (S,L), 93 (Y,T,C), 94 (D,T), 100 (I,L,V), 102 (S,G,N), 103 (S,T), 104 (V,A), 110 (Y,L), 117 (G,H), 120 (M,L), 134 (S,A,P), 135 (G,A), 136 (G,A,S), 140 (V,D), 144 (L,T), 153 (A,T), 173 (G,A,C), 174 (T,C,A), 175 (L,H,S), 178 (F,H,Y), 183 (N,S), 185 (D,E), 189 (G,A), 193 (Y,F), 201 (S,C,A), 223 (G,D,K), 230 (V,A), 238 (N,L,M), 239 (K,A), 241 (A,L,S), 247 (G,A,S), 251 (Y,M), 260 (R,A,N), 262 (K,A), 269 (R,V,K), 및 285 (R,K,Y)로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 써몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 19

모 써몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 상기 변형은 활성 조합가능 돌연변이(activity combinable mutation)이고, 활성 조합가능 위치에서 테스트된 변형들 중 적어도 하나의 변형은 하기 기준을 만족하는, 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

씨몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 발현 및 세제 안정성 또는 열 안정성에 대해서는 0.5 이상이고, pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성에 대해서는 1.5 이상인 위치;

여기서, 상기 활성 조합가능 위치는 17, 19, 24, 25, 31, 33, 40, 48, 73, 79, 80, 81, 85, 86, 89, 94, 109, 117, 140, 141, 150, 151, 152, 153, 156, 158, 159, 160, 161, 168, 171, 174, 175, 176, 178, 180, 181, 182, 183, 189, 205, 206, 207, 210, 212, 213, 214, 218, 223, 224, 227, 235, 236, 237, 238, 239, 241, 244, 246, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 258, 259, 260, 261, 262, 266, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 276, 278, 279, 280, 282, 283, 294, 295, 296, 297, 300, 302, 306, 310, 및 312로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 씨몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 씨몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 20

제13항에 있어서, 모 씨몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하며, 상기 변형은 활성 조합가능 돌연변이이고, 활성 조합가능 위치에서 테스트된 변형들 중 적어도 하나의 변형은 하기 기준을 만족하는, 씨몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

씨몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 발현 및 세제 안정성 또는 열 안정성에 대해서는 0.5 이상이고, pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성에 대해서는 1.5 이상인 위치;

여기서, 상기 활성 조합가능 위치는 17, 19, 24, 25, 31, 33, 40, 48, 73, 79, 80, 81, 85, 86, 89, 94, 109, 117, 140, 141, 150, 152, 153, 156, 158, 159, 160, 161, 168, 171, 174, 175, 176, 178, 180, 181, 182, 183, 189, 205, 206, 207, 210, 212, 213, 214, 218, 223, 224, 227, 235, 236, 237, 238, 239, 241, 244, 246, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 258, 259, 260, 261, 262, 266, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 276, 278, 279, 280, 282, 283, 294, 295, 296, 297, 300, 302, 306, 310, 및 312로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 씨몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 씨몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 21

모 씨몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 씨몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 상기 변형은 활성 조합가능 돌연변이이고, 활성 조합가능 위치에서 테스트된 변형들 중 적어도 하나의 변형은 하기 기준을 만족하는, 씨몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

씨몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 발현 및 세제 안정성 또는 열 안정성에 대해서는 0.5 이상이고, pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성에 대해서는 1.5 이상인 위치;

여기서, 상기 변형은 17 (E,F,P), 19 (A,D,H,I,R,T,V), 24 (F,H), 25 (H), 31 (L), 33 (Q), 40 (C), 48 (A,R), 73 (Y), 79 (C), 80 (C,R), 81 (H), 85 (C,M,Y), 86 (V), 89 (K,R,T,V), 94 (E), 109 (D), 117 (A,K,R,T), 140 (S), 141 (T), 150 (E,M,W), 151 (A,C,E,I), 152 (D), 153 (V), 156 (H,R), 158 (F,G,I,V), 159 (F,I,K), 160 (S), 161 (Y), 168 (N), 171 (D), 174 (S,V), 175 (C,E,F,G,I), 176 (E,Q), 178 (C,M), 180 (L,W), 181 (Y), 182 (F,R), 183 (H,I,L,M,Q,R,T), 189 (C), 205 (C,F), 206 (F,H,I,T,V,Y), 207 (T), 210 (A,E,F,G,H,T), 212 (F,H,K,M,N,R,S,T), 213 (I,K,R,V,Y), 214 (Q), 218 (R), 223 (Y), 224 (I,R), 227 (C,E,G,K,Q,R,S,T,V), 235 (D,L,T), 236 (P), 237 (A,Q), 238 (A,C,D,E,R,S), 239 (C,G,H,L,Q,R,S,V,Y), 241 (E,F,G,I,T,V), 244 (Q), 246 (K,R), 248 (C,H), 249 (G,V), 250 (F,S), 251 (H), 252 (F,I,L), 253 (A,D,E,P), 254 (C,F,G,H,I,P), 255 (F,Q), 258 (F), 259 (I), 260 (C,D,I), 261 (K,R,T), 262 (C,F,H,L,P,R), 266 (W), 268 (F,R), 269 (P,T,W,Y), 270 (M,N,P,V), 271 (V), 272 (R), 273 (R), 274 (D,E), 276 (G,S), 278 (V), 279 (E), 280 (P,R,V), 282 (P), 283 (A,C,E,G,H,T,V), 294 (T), 295 (R), 296 (E,I), 297 (I,V), 300 (Q), 302 (W), 306 (Y), 310 (I,N), 및 312 (Q)로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 씨몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 씨몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 22

모 씨몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 씨몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 상기 씨몰리신 효소 변이체는 모 씨몰리신 효소와 비교하여 pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 또는 세제 안정성 또는 열 안정성이 개선되고, 상기 변형은 서열 번호 3에 제시된 씨몰

리신의 아미노산 서열의 모든 잔기에 대한 평균 주쇄 온도 인자를 초과하여 관측 분산의 1.5배보다 큰 온도 인자를 갖는 위치에 있고;

상기 잔기 위치는 1, 2, 127, 128, 180, 181, 195, 196, 197, 198, 199, 211, 223, 224, 298, 299, 300, 및 316으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 써몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨지는, 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편.

청구항 23

모 써몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 상기 써몰리신 효소 변이체는 모 써몰리신 효소와 비교하여 pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 또는 세제 안정성 또는 열 안정성이 개선되고, 상기 변형은 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열의 모든 잔기에 대한 평균 주쇄 온도 인자를 초과하여 관측 분산의 1.5배보다 큰 온도 인자를 갖는 위치에 있고;

상기 잔기 위치는 1, 2, 127, 180, 181, 195, 196, 197, 198, 199, 211, 223, 224, 298, 299, 300, 및 316으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 써몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨지는, 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편.

청구항 24

모 써몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 상기 써몰리신 효소 변이체는 모 써몰리신 효소와 비교하여 세제 안정성 또는 열 안정성이 개선되고, 상기 변형은 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열의 모든 잔기에 대한 평균 주쇄 온도 인자를 초과하여 관측 분산의 1.5배보다 큰 온도 인자를 갖는 위치에 있고;

상기 변형은 1(I,V), 2(T,C,I,M,P,Q,V), 127(G,C), 128(Q,E,F), 180(A,E,N), 181(N,A,G,Q,S), 196(G,L,Y), 197(I,F), 198(S,A,C,D,E,H,I,M,P,Q,T,V,Y), 211(Y,A,C,E,F,H,I,Q,S,T,V,W), 224(T,D,H,Y), 298(S,A,C,E,F,G,K,M,N,P,Q,R,T,W,Y), 299(T,A,C,D,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,W), 및 316(K,A,D,E,H,M,N,P,Q,S,T,V,Y)으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 써몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨지는, 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편.

청구항 25

모 써몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 상기 변형은 생산 돌연변이(productive mutation)이고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 적어도 하나의 변형은 하기 기준을 만족하는, 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

발현, 세제 안정성, 열 안정성, PAS-38 마이크로스와치 세정 활성, 또는 Abz-AGLA-Nba에 대한 활성의 파라미터들 중 적어도 3개에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 1 이상인 위치;

여기서, 활성 조합가능한 위치는 002, 048, 063, 087, 096, 180, 198, 244, 277, 283, 293, 295, 298, 및 301로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 써몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 26

모 써몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편으로서, 상기 변형은 생산 돌연변이이고, 상기 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 적어도 하나의 변형은 하기 기준을 만족하는, 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편:

발현, 세제 안정성, 열 안정성, PAS-38 마이크로스와치 세정 활성, 또는 Abz-AGLA-Nba에 대한 활성의 파라미터들 중 적어도 3개에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 1 이상인 위치;

여기서, 활성 조합가능한 위치는 T002I, T002M, T048E, A058L, F063C, V087L, N096H, A180E, S198A, I244T, P277R, T278R, Q283E, T293L, T293N, L295F, S298A, 및 Q301I로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 써몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨짐.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변이체는 M4 웨티다제인, 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 변이체는 MA 클랜의 구성원인, 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편.

청구항 29

제27항에 있어서, 상기 변이체는 PepSY-웨티다제_M4-웨티다제_M4_C 패밀리의 구성원인, 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편.

청구항 30

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변이체는 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열에 대해 50% 이상의 동일성(identity)을 갖는, 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 써몰리신 효소 변이체는 바실러스(*Bacillus*), 제오바실러스(*Geobacillus*), 알리사이클로바실러스(*Alicyclobacillus*), 락토바실러스(*Lactobacillus*), 엑시구오박테리움(*Exiguobacterium*), 브레비바실러스(*Brevibacillus*), 파에니바실러스(*Paenibacillus*), 헤르페토시폰(*Herpetosiphon*), 오세아노바실러스(*Oceanobacillus*), 쇠와넬라(*Shewanella*), 클로스트리듐(*Clostridium*), 스타필로코쿠스(*Staphylococcus*), 플라보박테리움(*Flavobacterium*), 스티그마텔라(*Stigmella*), 미소코쿠스(*Myxococcus*), 비브리오(*Vibrio*), 메타노사르시나(*Methanosaarcina*), 크리세오박테리움(*Chryseobacterium*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 크리벨라(*Kribbella*), 자니박터(*Janibacter*), 노카르디오이데스(*Nocardiooides*), 잔타모나스(*Xanthomonas*), 마이크로모노스포라(*Micromonospora*), 부르크홀데리아(*Burkholderia*), 데할로코코이데스(*Dehalococcoides*), 크로세이박터(*Croceibacter*), 코르디아(*Kordia*), 마이크로실라(*Microscilla*), 써모악티노마이세스(*Thermoactinomyces*), 클로로플렉서스(*Chloroflexus*), 리스테리아(*Listeria*), 플레시오시스티스(*Plesiocystis*), 할리스코메노박터(*Haliscomenobacter*), 사이토파가(*Cytophaga*), 하헬라(*Haehella*), 아트로박터(*Arthrobacter*), 브라기박테리움(*Brachybacterium*), 클라비박터(*Clavibacter*), 마이크로박테리움(*Microbacterium*), 인트拉斯포란지움(*Intrasporangium*), 프란키아(*Frankia*), 메이오썩더스(*Meiothermus*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 리시누스(*Ricinus*), 카테눌리스포라(*Catenulispora*), 아나바에나(*Anabaena*), 노스톡(*Nostoc*), 할로모나스(*Halomonas*), 크로모할로박터(*Chromohalobacter*), 보르데텔라(*Bordetella*), 바리오보락스(*Variovorax*), 딕케야(*Dickeya*), 펙토박테리움(*Pectobacterium*), 시트로박터(*Citrobacter*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 살모넬라(*Salmonella*), 에르위니아(*Erwinia*), 판토에아(*Pantoea*), 라넬라(*Rahnella*), 세라티아(*Serratia*), 제오더마토필루스(*Geodermatophilus*), 젬마타(*Gemmata*), 제노라브두스(*Xenorhabdus*), 포토라브두스(*Photorhabdus*), 아스퍼질러스(*Aspergillus*), 네오사르토리아(*Neosartorya*), 피렌노포라(*Pyrenophora*), 사카로폴리스포라(*Saccharopolyspora*), 넥트리아(*Nectria*), 지베렐라(*Gibberella*), 메타리지움(*Metarhizium*), 와들리아(*Waddlia*), 시아노테세(*Cyanothecae*), 셀룰파가(*Celluliphaga*), 프로비덴시아(*Providencia*), 브라디리조비움(*Bradyrhizobium*), 아그로박테리움(*Agrobacterium*), 무실라기니박터(*Mucilaginibacter*), 세라티아(*Serratia*), 소란지움(*Sorangium*), 스트렙토스포란지움(*Streptosporangium*), 레니박테리움(*Renibacterium*), 아에로모나스(*Aeromonas*), 레이네케아(*Reinekea*), 크로모박테리움(*Chromobacterium*), 모리텔라(*Moritella*), 할리안지움(*Halangium*), 칸지엘라(*Kangiella*), 마리노모나스(*Marinomonas*), 비브리오날레스(*Vibrionales*), 리스토넬라(*Listonella*), 살리니비브리오(*Salinivibrio*), 포토박테리움(*Photobacterium*), 알테로모나달레스(*Alteromonadales*), 레지오넬라(*Legionella*), 테레дин이박터(*Teredinibacter*), 레이네케아(*Reinekea*), 하이드로제니비르가(*Hydrogenivirga*), 및 슈도알테로모나스(*Pseudoalteromonas*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 속(genus)으로부터의 것인, 써몰리신 효소 변이체.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 써몰리신 효소 변이체는 바실러스, 제오바실러스, 알리사이클로바실러스, 락토바실러스, 엑시구오박테리움, 브레비바실러스, 파에니바실러스, 헤르페토시폰, 오세아노바실러스

스, 쉬와넬라, 클로스트리듐, 스타필로코쿠스, 플라보박테리움, 스티그마텔라, 박소코쿠스, 비브리오, 메타노사르시나, 크리세오박테리움, 및 슈도알테로모나스로 이루어진 군으로부터 선택되는 속으로부터의 것인, 써몰리신 효소 변이체.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 써몰리신 효소는 바실러스 속으로부터의 것인, 써몰리신 효소 변이체.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항의 써몰리신 효소 변이체를 적어도 하나 포함하는, 세정 조성물.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 세정 조성물은 과립, 분말, 고체, 바(bar), 액체, 정제(tablet), 젤, 또는 페이스트 조성물인, 세정 조성물.

청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서, 상기 세정 조성물은 세제 조성물인, 세정 조성물.

청구항 37

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세정 조성물은 세탁 세제 조성물, 식기 세제 조성물, 또는 경질 표면 세정 조성물인, 세정 조성물.

청구항 38

제36항에 있어서, 상기 식기 세제는 손 식기세척 세제 조성물 또는 자동 식기세척 세제 조성물인, 세정 조성물.

청구항 39

제36항에 있어서, 상기 세정 조성물은 세탁 세제 조성물인, 세정 조성물.

청구항 40

제34항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 표백제를 추가로 포함하는, 세정 조성물.

청구항 41

제34항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세정 조성물은 포스페이트가 없는, 세정 조성물.

청구항 42

제34항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세정 조성물은 포스페이트를 함유하는, 세정 조성물.

청구항 43

제34항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 추가 효소를 추가로 포함하는, 세정 조성물.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 적어도 하나의 추가 효소는 아실 트랜스퍼라제, 알파-아밀라제, 베타-아밀라제, 알파-갈락토시다제, 아라비노시다제, 아릴 에스테라제, 베타갈락토시다제, 카라기나제, 카탈라제, 셀로비오하이드롤라제, 셀룰라제, 콘드로이티나제, 큐티나제, 엔도-베타-1, 4-글루카나제, 엔도-베타-만나나제, 에스테라제, 엑소-만나나제, 갈락타나제, 글루코아밀라제, 헤미셀룰라제, 히알루로니다제, 캐라티나제, 락카제, 락타제, 리그니나제, 리파제, 리폭시게나제, 만나나제, 옥시다제, 펩테이트 리아제, 펩틴 아세틸 에스테라제, 펩티나제, 펜토사나제, 퍼옥시다제, 페놀옥시다제, 포스파타제, 포스포리파제, 피타제, 폴리갈락투로나제, 프로테아제, 폴루라나제, 리덕타제, 람노갈락투로나제, 베타-글루카나제, 탄나제, 트랜스글루타미나제, 자일란 아세틸-에스테라제, 자일라나제, 자일로글루카나제, 및 자일로시다제, 추가적인 메탈로프로테아제 효소, 및 이들의 조합으로 이루어

진 군으로부터 선택되는, 세정 조성물.

청구항 45

표면 또는 물품을 제1항 내지 제33항 중 어느 한 항의 써몰리신 효소 변이체를 적어도 하나 포함하는 세정 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세정 방법.

청구항 46

표면 또는 물품을 제34항 내지 제44항 중 어느 한 항에 제시된 세정 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세정 방법.

청구항 47

제45항 또는 제46항에 있어서, 상기 표면 또는 물품을 상기 세정 조성물과 각각 접촉시키는 단계 후에 상기 표면 또는 물품을 헹구는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 48

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 물품은 식기류인, 방법.

청구항 49

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 물품은 패브릭(fabric)인, 방법.

청구항 50

제45항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표면 또는 물품을 상기 세정 조성물과 접촉시키는 단계 후에 상기 표면 또는 물품을 헹구는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 표면 또는 물품을 헹구는 단계 후에 상기 표면 또는 물품을 건조하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 52

제34항 내지 제44항 중 어느 한 항에 제시된 세정 조성물 및 세정을 필요로 하는 표면 또는 물품을 제공하는 단계; 및 상기 세정 조성물을, 상기 표면 또는 물품의 세정을 위해 적합한 조건 하에서, 세정을 필요로 하는 상기 표면 또는 물품과 접촉시켜 세정된 표면 또는 물품을 생성하는 단계를 포함하는, 표면 또는 물품을 세정하는 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 세정된 표면 또는 물품을 헹구어, 헹궈진 표면 또는 물품을 생성하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 54

제52항 또는 제53항에 있어서, 상기 헹궈진 표면 또는 물품을 건조하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원과의 상호 참조

본 출원은 2012년 11월 5일자로 출원된 미국 가특허 출원 제61/722,660호로부터의 우선권의 이익을 주장하며, 상기 출원은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된다.

배경 기술

[0003]

바실러스(*Bacillus*)는, 발효에 의해 다양으로 값싸게 제조될 수 있는, 다수의 산업적으로 유용한 효소를 분비하는 그람-양성 박테리아이다. 분비되는 바실러스 효소의 예는 서브틸리신 세린 프로테아제, 아연 함유 중성 프로테아제, 알파-아밀라제, 및 셀룰라제이다. 바실러스 프로테아제는 직물(textile), 세탁물, 및 가내 공업에서 널리 사용된다 (문헌[Galante, Current Organic Chemistry, 7:1399-1422, 2003]; 및 문헌[Showell, Handbook of Detergents, Part D: Formulation, Hubbard (ed.), NY: Taylor and Francis Group, 2006]). 미생물에서 발견되는 프로테아제는 그의 촉매적 메커니즘에 기초하여 하기 4가지 그룹으로 분류된다: 세린 프로테아제; 메탈로-프로테아제; 시스테인 프로테아제; 및 아스파르트산 프로테아제. 세린 프로테아제는 일칼리 pH에서 최적이며, 메탈로프로테아제는 중성 근처에서 최적으로 활성이고, 시스테인 및 아스파르트산 효소는 산성 pH에서 최적이다 (문헌[Biotechnology Handbooks, *Bacillus*, vol. 2, edited by Harwood, 1989 Plenum Press, New York]). 세린 프로테아제는 산업용 효소 분야에서 오랫동안 알려져 있었지만, 특정 조건 및 용도에 적합한 엔지니어링된 프로테아제(engineered protease)에 대한 필요성이 남아 있다.

발명의 내용

[0004]

본 발명은, 특히, 써몰리신(thermolysin) 효소, 그를 암호화하는 핵산, 및 그의 생산 및 사용과 관련된 조성물 및 방법을 제공한다.

[0005]

일부 실시 형태에서, 본 발명은 모(parent) 써몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 써몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편이고, 여기서, 변형은 써몰리신 효소 변이체의 생산 위치(productive position)에 있고, 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 75% 이상은 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족한다: a) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성(microswatch cleaning), Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (performance index, PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치; b) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치; c) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치; 여기서, 생산 위치는 2, 26, 47, 49, 53, 65, 87, 91, 96, 108, 118, 128, 154, 179, 196, 197, 198, 199, 209, 211, 217, 219, 225, 232, 256, 257, 259, 261, 265, 267, 272, 276, 277, 286, 289, 290, 293, 295, 298, 299, 300, 301, 303, 305, 308, 311, 및 316으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서, 써몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0006]

일부 실시 형태에서, 변형은 2 (T,F,L,P,S,V,W,Y,Q,A,C,I,K,M), 26 (T,K,L,R,V,Y,W,F,G,H,I,M,C,D), 47 (R,A,C,H,K,N,D,E,G,L,M,Q,T), 49 (T,A,D,F,H,I,S,W,L,N,Q,V,E,M,Y), 53 (S,F,H,I,M,Q,T,W,K,R,A,N,V,C,L), 65 (S,I,M,Q,V,L,T,W,A,D,E,P,Y), 87 (V,D,E,G,I,S,P,R,T,C,K,L,M,N,Q,W,Y), 91 (L,D,E,F,K,M,P,Q,S,A,N,R,W,Y), 96 (N,C,D,I,V,F,T,G,H,Q,R,S,W,K,L,Y), 108 (Q,C,E,F,H,A,D,I,K,N,L,M), 118 (S,C,G,E,A,D,M,Q,R,T,V), 128 (Q,C,D,E,R,S,V,I,K,A,L,Y), 154 (G,L,Q,S,T,D,I,W,C,N,A,H,K,M,Y), 179 (Y,A,D,H,M,N,Q,S,T,W,F), 196 (G,D,E,T,K,R,V,H,L,Y,A,W), 197 (I,D,K,L,T,V,W,Y,A,H,N,E,Q,R,F,C), 198 (S,C,E,F,G,H,I,P,Q,T,V,M,N,R,W,A,K), 199 (G,C,E,F,H,Q,S,T,W,L,A,Y), 209 (A,D,E,L,S,T,V,G,I,K,P,R,Y,C,M), 211 (Y,A,C,D,F,G,H,I,L,N,Q,S,T,E,R), 217 (Y,Q,S,T,V,W,G,A,F,M,N,C,L), 219 (K,D,F,G,H,I,M,N,Q,T,A,E,R,S), 225 (Q,D,G,H,I,P,V,W,A,M,R,C,E,K,L,S), 232 (I,C,E,F,K,M,N,Q,W,G,L,R,S,T,V,Y), 256 (V,L,T,K,A,D,F,G,H,R,S,N), 257 (G,C,D,E,L,N,P,Q,S,T,Y,K,R), 259 (G,A,C,E,F,H,L,M,W,K,R,N,S,T), 261 (D,A,N,P,V,W,G,H,I,S), 265 (K,A,C,D,M,P,Q,S,G,I,L,R,N), 267 (F,E,G,N,S,V,W,A,C,H,I,K,L,M,T,Y), 272 (T,E,L,V,W,P,Y,C,F,N,Q,A,K), 276 (T,C,F,I,P,Q,W,H,A,L,V,Y), 277 (P,Q,S,T,E,F,G,H,N,R,V,W,A,D,Y), 286 (A,D,E,F,G,H,I,S,P,C,Q,R,T,K,L,M,N,Y), 289 (V,C,E,F,G,I,N,S,W,R,T,L,M,Y,A), 290 (Q,C,D,F,G,L,W,Y,R,T,V,A,H,N), 293 (T,C,E,F,G,H,Q,S,N,V,W,A,I,K,L,M,Y), 295 (L,C,I,N,T,V,F,G,A,K,M,W), 298 (S,C,T,W,Y,E,N,P,A,G,K,M,R), 299 (T,C,F,L,M,R,W,P,D,Q,N,A,K), 300 (S,C,K,M,R,Y,I,L,H,P,V,W,A,G,T,D,N), 301 (Q,E,H,P,R,L,C,F,G,W,M,S,T,V,K), 303 (V,C,H,G,K,L,R,W,A,P,Y), 305 (S,G,I,L,N,W,Y,Q,H,T,V,A,K,M), 308 (Q,C,D,F,G,I,M,R,V,W,Y,A,L), 311 (D,C,E,F,G,I,Q,S,T,A,K,L,M,V,W,Y), 및 316 (K,D,E,F,G,H,L,N,P,Q,R,S,V,W,Y,A,M)으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서, 써몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0007]

일부 실시 형태에서, 본 발명은 모 썬몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 썬몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편이고, 여기서, 변형은 썬몰리신 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 40% 이상 75% 미만은 (상기) a, b, 및 c에 열거된 기준들 중 적어도 하나를 만족하고, 여기서, 생산 위치는 1, 4, 17, 25, 40, 45, 56, 58, 61, 74, 86, 97, 101, 109, 149, 150, 158, 159, 172, 181, 214, 216, 218, 221, 222, 224, 250, 253, 254, 258, 263, 264, 266, 268, 271, 273, 275, 278, 279, 280, 282, 283, 287, 288, 291, 297, 302, 304, 307, 및 312로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서, 썬몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0008]

일부 실시 형태에서, 변형은 1 (I,K,M,V,A,H,W,Y,C,L), 4 (T,E,A,N,R,V,K,L,M,Y), 17 (Q,I,W,Y,C,R,V,T,L), 25 (S,D,F,A,C,K,M,R), 40 (F,E,G,M,Q,S,Y,W,A,K,L), 45 (K,E,L,S,F,H,Q,Y,A,G,M), 56 (A,K,Q,V,W,H,I,Y,E,M), 58 (A,N,Y,C,V,E,L), 61 (Q,M,R,W,F,V,C,I,L), 74 (H,E,L,V,C,F,M,N,Q,W), 86 (N,L,S,Y,A,C,E,F,G,K,D), 97 (N,K,C,R,S,Y,E,M), 101 (R,T,C,L,S,H), 109 (G,A,L,S,E,M,R,W), 149 (T,M,V,A,L,D,S,N), 150 (D,A,F,K,N,Q,T,V,S), 158 (Q,A,K,M,N,L,R,Y,S), 159 (N,R,W,A,C,G,M,T,S,Y), 172 (F,G,L,M,Q,S,V,W,Y,D,H), 181 (N,L,A,G,K,M,T,S), 214 (P,C,G,K,S,N,A,R), 216 (H,C,E,S,T,R,A), 218 (S,K,L,Y,F,G,T,V), 221 (Y,K,N,Q,R,S,T,V,A,F,G,M), 222 (T,C,D,L,Y,I,V,A,M,K), 224 (T,K,M,F,L,P,Q,V,Y,E,H), 250 (H,A,C,K,M,N,P,Q,R,V,Y), 253 (V,N,T,I,R,Y,M,Q), 254 (S,A,M,R,Y,K,L,N,V,W), 258 (I,E,L,M,N,R,S,A,C,K,Q,V), 263 (L,C,I,Q,T,H,K,N,V,A,M), 264 (G,C,R,A,N,P,Q,S,T), 266 (I,A,F,L,S,C,M,T,V), 268 (Y,M,Q,V,A,S,K), 271 (L,A,D,F,I,N,Y,H), 273 (Q,A,H,Y,C,S,W,E,G,N), 275 (L,I,M,V,C,Q,S,T), 278 (T,G,K,R,Y,C,H,M,N,Q,S), 279 (S,A,D,I,L,M,N,Q,T,G), 280 (N,A,C,D,E,G,Q,H,T), 282 (S,K,N,R,A,H,L,M,T), 283 (Q,K,L,P,R,W,Y,S), 287 (A,I,L,N,V,Y,K,R,T,D,C), 288 (A,C,I,S,T,V,Y,N,L,M), 291 (S,E,I,L,M,N,V,A,T), 297 (G,A,M,R,Y,C,F,K,T,D,N), 302 (E,K,L,G,T,V,D,Q,A), 304 (A,C,D,L,N,R,S,T,W,E,K,Y), 307 (K,A,C,G,I,M,N,Q,R,W,Y,H), 및 312 (A,G,M,V,L,N,R,T,C)로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서, 썬몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0009]

일부 실시 형태에서, 본 발명은 모 썬몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 썬몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편이고, 여기서, 변형은 썬몰리신 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 15% 이상 40% 미만은 (상기) a, b, 및 c에 열거된 기준들 중 적어도 하나를 만족하고, 여기서, 생산 위치는 5, 9, 11, 19, 27, 31, 33, 37, 46, 64, 73, 76, 79, 80, 85, 89, 95, 98, 99, 107, 127, 129, 131, 137, 141, 145, 148, 151, 152, 155, 156, 160, 161, 164, 168, 171, 176, 180, 182, 187, 188, 205, 206, 207, 210, 212, 213, 220, 227, 234, 235, 236, 237, 242, 244, 246, 248, 249, 252, 255, 270, 274, 284, 294, 296, 306, 309, 310, 313, 314, 및 315로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서, 썬몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0010]

일부 실시 형태에서, 변형은 5 (S,D,N,P,H,L), 9 (V,L,T,I), 11 (R,I,Y,K), 19 (N,L,Y,K,S), 27 (Y,W,A,M,V,C,L), 31 (Q,A,K,V,I,C,Y), 33 (N,S,T,K,A,C,L,M), 37 (N,D,Q,R,L,K), 46 (Y,L,H,N,C), 64 (A,H,Q,T,D,E), 73 (A,I,F,L,M,W), 76 (Y,H,L,M,Q,T), 79 (V,L,Q,T,A,N,S), 80 (T,I,D,A,L,N), 85 (K,E,A,L,N,R,S), 89 (N,L,M,H), 95 (G,A,D,H,M,N,S), 98 (A,C,E,H,R,Y,K,V), 99 (A,E,K,P,R,S), 107 (S,D,K,Y,A,G), 127 (G,C,D,E), 129 (T,I,R,E,Y,L,M), 131 (I,Y,W,L), 137 (I,P,A,E,T,V,L), 141 (A,S,C,G), 145 (T,A,C,E,G,M,N,Q), 148 (V,L,N,Y,M,A,Q), 151 (Y,K,G,H,S,W), 152 (T,S,L,M,G), 155 (L,C,I,M), 156 (I,M,T,L,Q), 160 (E,L,Y,Q), 161 (S,A,N,P,T), 164 (I,L,N,S,T,V,C,A), 168 (I,A,M,T,L), 171 (I,C,E,F,L,S,G), 176 (V,L,N,C), 180 (A,E,G,K,T,S), 182 (K,L,A,W), 187 (E,L,D), 188 (I,L,V), 205 (M,L,A,V,Q), 206 (S,A,C,K,L,M,R), 207 (D,A,H,N), 210 (K,I,L,V), 212 (G,Y,A,D,Q), 213 (D,N,S,L,A,G,W), 220 (R,K,V,A), 227 (N,D,L,Y,A), 234 (S,D,N,A,C), 235 (G,M,C,Q,S,A), 236 (I,M,A,C), 237 (I,N,F,M), 242 (Y,C,F,N,V), 244 (I,T,V,F,A,M,L), 246 (Q,E,N,T,L,C,D), 248 (G,A,E,S), 249 (T,K,M,N,L,Y,P), 252 (G,K,Y,A,S,T,W), 255 (V,L,P,A,Y,M,N), 270 (A,C,F,I,L,S,G), 274 (Y,F,H,A,C,Q,T,M), 284 (L,V,W,A,M,Y), 294 (D,A,V,Q,N), 296 (Y,N,L,R,H,W,M), 306 (V,A,S,F,I,L,T), 309 (A,G,S,T,V,C), 310 (F,A,C,W,M), 313 (V,T,A,G,L,I,C), 314 (G,A,E,H,M,S,W,Q), 및 315 (V,A,C,I,M,L,T)로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서, 썬몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0011]

일부 실시 형태에서, 본 발명은 모 썬몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 썬몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편이고, 여기서, 변형은 썬몰리신 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 생산 위치에서 테스트된 변형

들 중 하나 이상의 변형이지만 15% 미만은 (상기) a, b, 및 c에 열거된 기준들 중 적어도 하나를 만족하고, 여기서, 생산 위치는 3, 6, 7, 20, 23, 24, 44, 48, 50, 57, 63, 72, 75, 81, 92, 93, 94, 100, 102, 103, 104, 110, 117, 120, 134, 135, 136, 140, 144, 153, 173, 174, 175, 178, 183, 185, 189, 193, 201, 223, 230, 238, 239, 241, 247, 251, 260, 262, 269, 및 285로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서, 썬몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0012] 일부 실시 형태에서, 변형은 3 (G,Y), 6 (T,C,V), 7 (V,L,I), 20 (I,L,V), 23 (T,F,W), 24 (Y,W), 44 (A,C), 48 (T,E,D), 50 (L,P), 57 (D,K), 63 (F,Y,C), 72 (D,F,W), 75 (Y,A), 81 (Y,F), 92 (S,L), 93 (Y,T,C), 94 (D,T), 100 (I,L,V), 102 (S,G,N), 103 (S,T), 104 (V,A), 110 (Y,L), 117 (G,H), 120 (M,L), 134 (S,A,P), 135 (G,A), 136 (G,A,S), 140 (V,D), 144 (L,T), 153 (A,T), 173 (G,A,C), 174 (T,C,A), 175 (L,H,S), 178 (F,H,Y), 183 (N,S), 185 (D,E), 189 (G,A), 193 (Y,F), 201 (S,C,A), 223 (G,D,K), 230 (V,A), 238 (N,L,M), 239 (K,A), 241 (A,L,S), 247 (G,A,S), 251 (Y,M), 260 (R,A,N), 262 (K,A), 269 (R,V,K), 및 285 (R,K,Y)로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서, 썬몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0013] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 모 썬몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 썬몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편이고, 여기서, 변형은 활성 조합가능 돌연변이(activity combinable mutation)이고, 활성 조합가능 위치에서 테스트된 변형들 중 적어도 하나의 변형은 하기 기준을 만족하고: 썬몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 발현 및 세제 안정성 또는 열 안정성에 대해서는 0.5 이상이고, pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성에 대해서는 1.5 이상인 위치; 여기서, 활성 조합가능 위치는 17, 19, 24, 25, 31, 33, 40, 48, 73, 79, 80, 81, 85, 86, 89, 94, 109, 117, 140, 141, 150, 151, 152, 153, 156, 158, 159, 160, 161, 168, 171, 174, 175, 176, 178, 180, 181, 182, 183, 189, 205, 206, 207, 210, 212, 213, 214, 218, 223, 224, 227, 235, 236, 237, 238, 239, 241, 244, 246, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 258, 259, 260, 261, 262, 266, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 276, 278, 279, 280, 282, 283, 294, 295, 296, 297, 300, 302, 306, 310, 및 312로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서, 썬몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0014] 일부 실시 형태에서, 변형은 17 (E,F,P), 19 (A,D,H,I,R,T,V), 24 (F,H), 25 (H), 31 (L), 33 (Q), 40 (C), 48 (A,R), 73 (Y), 79 (C), 80 (C,R), 81 (H), 85 (C,M,Y), 86 (V), 89 (K,R,T,V), 94 (E), 109 (D), 117 (A,K,R,T), 140 (S), 141 (T), 150 (E,M,W), 151 (A,C,E,I), 152 (D), 153 (V), 156 (H,R), 158 (F,G,I,V), 159 (F,I,K), 160 (S), 161 (Y), 168 (N), 171 (D), 174 (S,V), 175 (C,E,F,G,I), 176 (E,Q), 178 (C,M), 180 (L,W), 181 (Y), 182 (F,R), 183 (H,I,L,M,Q,R,T), 189 (C), 205 (C,F), 206 (F,H,I,T,V,Y), 207 (T), 210 (A,E,F,G,H,T), 212 (F,H,K,M,N,R,S,T), 213 (I,K,R,V,Y), 214 (Q), 218 (R), 223 (Y), 224 (I,R), 227 (C,E,G,K,Q,R,S,T,V), 235 (D,L,T), 236 (P), 237 (A,Q), 238 (A,C,D,E,R,S), 239 (C,G,H,L,Q,R,S,V,Y), 241 (E,F,G,I,T,V), 244 (Q), 246 (K,R), 248 (C,H), 249 (G,V), 250 (F,S), 251 (H), 252 (F,I,L), 253 (A,D,E,P), 254 (C,F,G,H,I,P), 255 (F,Q), 258 (F), 259 (I), 260 (C,D,I), 261 (K,R,T), 262 (C,F,H,L,P,R), 266 (W), 268 (F,R), 269 (P,T,W,Y), 270 (M,N,P,V), 271 (V), 272 (R), 273 (R), 274 (D,E), 276 (G,S), 278 (V), 279 (E), 280 (P,R,V), 282 (P), 283 (A,C,E,G,H,T,V), 294 (T), 295 (R), 296 (E,I), 297 (I,V), 300 (Q), 302 (W), 306 (Y), 310 (I,N), 및 312 (Q)로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서, 썬몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0015] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 모 썬몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 썬몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편이며, 여기서, 썬몰리신 효소 변이체는 모 썬몰리신 효소와 비교하여 pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성 또는 세제 안정성 또는 열 안정성이 개선되고, 변형은 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열의 모든 잔기에 대한 평균 주체 온도 인자(mean main chain temperature factor)를 초과하여 관측 분산(observed variance)의 1.5배보다 큰 온도 인자를 갖는 위치에 있고; 잔기 위치는 1, 2, 127, 128, 180, 181, 195, 196, 197, 198, 199, 211, 223, 224, 298, 299, 300, 및 316으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서, 썬몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0016] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 모 썬몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 썬몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편이며, 여기서, 썬몰리신 효소 변이체는 모 썬몰리신 효소와 비교하여 세제 안정성 또는 열 안정성이 개선되고, 변형은 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열의 모든 잔기에 대한 평균 주체 온도 인

자를 초과하여 관측 분산의 1.5배보다 큰 온도 인자를 갖는 위치에 있고; 변형은 1(I,V), 2(T,C,I,M,P,Q,V), 127(G,C), 128(Q,C,E,F,I,L,V,Y), 180(A,E,N), 181(N,A,G,Q,S), 196(G,L,Y), 197(I,F), 198(S,A,C,D,E,H,I,M,P,Q,T,V,Y), 211(Y,A,C,E,F,H,I,Q,S,T,V,W), 224(T,D,H,Y), 298(S,A,C,E,F,G,K,M,N,P,Q,R,T,W,Y), 299(T,A,C,D,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,W), 및 316(K,A,D,E,H,M,N,P,Q,S,T,V,Y)으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서, 썬몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0017] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 모 썬몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 썬몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편이고, 여기서, 변형은 썬몰리신 효소 변이체의 생산 위치에 있고, 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 75% 이상은 하기 기준들 중 적어도 하나를 만족하고: a) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 썬몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치; b) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 썬몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치; c) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 썬몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치; 여기서, 생산 위치는 2, 87, 96, 198, 277, 293, 295, 298 및 301로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서, 썬몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0018] 1. 추가의 실시 형태에서, 생산 위치는 2 (T,F,L,P,S,V,W,Y,Q,A,C,I,K,M), 87 (V,D,E,G,I,S,P,R,T,C,K,L,M,N,Q,W,Y), 96 (N,C,D,I,V,F,T,G,H,Q,R,S,W,K,L,Y), 198 (S,C,E,F,G,H,I,P,Q,T,V,M,N,R,W,A,K), 277 (P,Q,S,T,E,F,G,H,N,R,V,W,A,D,Y), 293 (T,C,E,F,G,H,Q,S,N,V,W,A,I,K,L,M,Y), 295 (L,C,I,N,T,V,F,G,A,K,M,W), 298 (S,C,T,W,Y,E,N,P,A,G,K,M,R), 301 (Q,E,H,P,R,L,C,F,G,W,M,S,T,V,K)로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서, 썬몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0019] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 모 썬몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 썬몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편이고, 여기서, 변형은 생산 위치에 있고, 생산 위치에서 테스트된 변형들은 하기 기준을 만족하고: 발현, 세제 안정성, 열 안정성, PAS-38 마이크로스와치 세정 활성, 또는 Abz-AGLA-Nba에 대한 활성의 파라미터들 중 적어도 3개에 대해 썬몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 1 이상인 위치; 여기서, 생산 위치는 278, 283, 180, 244, 48 및 63으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서, 썬몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0020] 추가의 실시 형태에서, 생산 위치는 T278R, Q283E, A180E, I244T, T48E 및 F63C로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서, 썬몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0021] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 모 썬몰리신 효소에 대한 아미노산 변형을 포함하는 썬몰리신 효소 변이체 또는 이의 활성 단편이고, 여기서, 변형은 생산 위치에 있고, 생산 위치에서 테스트된 변형들 중 적어도 하나의 변형은 하기 기준을 만족하고: 발현, 세제 안정성, 열 안정성, PAS-38 마이크로스와치 세정 활성, 또는 Abz-AGLA-Nba에 대한 활성의 파라미터들 중 적어도 전부에 대해 썬몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.5 이상이고 파라미터들 중 하나 이하에 대해 0.8 미만인 위치; 여기서, 생산 위치는 019, 025, 026, 063, 091, 096, 097, 101, 109, 118, 131, 140, 158, 159, 175, 180, 219, 225, 232, 244, 246, 261, 277, 293, 300, 301, 301, 303, 305, 및 311로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서, 썬몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0022] 추가의 실시 형태에서, 생산 위치는 N019D, S025A, T026R, S065A, L091M, N096Q, N096R, N096Y, N097K, R101M, G109A, S118A, I131L, V140D, Q158A, N159E, N159K, L175V, A180R, G196T, G196Y, K219S, Q225E, I232R, I244L, Q246D, D261N, P277G, T293Y, S300G, Q301F, Q301M, V303R, S305A, D311A로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서, 썬몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0023] 일부 실시 형태에서, 썬몰리신 효소 변이체는 M4 펩티다제이다. 일부 실시 형태에서, 썬몰리신 효소 변이체는 MA 클렌의 구성원이다. 일부 실시 형태에서, 썬몰리신 효소 변이체는 PepSY-펩티다제_M4-펩티다제_M4_C 패밀리

의 구성원이다. 일부 실시 형태에서, 변이체는 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열에 대해 50% 이상의 동일성(identity)을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 써몰리신 효소 변이체는 바실러스, 제오바실러스 (*Geobacillus*), 알리사이클로바실러스 (*Alicyclobacillus*), 락토바실러스 (*Lactobacillus*), 엑시구오박테리움 (*Exiguobacterium*), 브레비바실러스 (*Brevibacillus*), 파에니바실러스 (*Paenibacillus*), 헤르페토시폰 (*Herpetosiphon*), 오세아노바실러스 (*Oceanobacillus*), 쉬와넬라 (*Shewanella*), 클로스트리듐 (*Clostridium*), 스타필로코쿠스 (*Staphylococcus*), 플라보박테리움 (*Flavobacterium*), 스티그마텔라 (*Stigmella*), 믹소코쿠스 (*Myxococcus*), 비브리오 (*Vibrio*), 메타노사르시나 (*Methanosa*), 크리세오박테리움 (*Chryseobacterium*), 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*), 크리넬라 (*Kribbella*), 자니박터 (*Janibacter*), 노카르디오이데스 (*Nocardioides*), 잔타모나스 (*Xanthomonas*), 마이크로모노스포라 (*Micromonospora*), 부르크홀데리아 (*Burkholderia*), 데할로코코이데스 (*Dehalococcoides*), 크로세이박터 (*Croceibacter*), 코르디아 (*Kordia*), 마이크로실라 (*Microscilla*), 써모악티노마이세스 (*Thermoactinomyces*), 클로로플렉서스 (*Chloroflexus*), 리스테리아 (*Listeria*), 플레시오시스티스 (*Plesiocystis*), 할리스코메노박터 (*Haliscomenobacter*), 사이토파가 (*Cytophaga*), 하헬라 (*Haella*), 아트로박터 (*Arthrobacter*), 브라기박테리움 (*Brachybacterium*), 클라비박터 (*Clavibacter*), 마이크로박테리움 (*Microbacterium*), 인트라스포란지움 (*Intrasporangium*), 프란카야 (*Frankia*), 메이오썩더스 (*Meiothermus*), 슈도모나스 (*Pseudomonas*), 리시누스 (*Ricinus*), 카테눌리스포라 (*Catenulispura*), 아나바에나 (*Anabaena*), 노스톡 (*Nostoc*), 할로모나스 (*Halomonas*), 크로모할로박터 (*Chromohalobacter*), 보르데텔라 (*Bordetella*), 바리오보락스 (*Variovorax*), 딕케야 (*Dickeya*), 페토박테리움 (*Pectobacterium*), 시트로박터 (*Citrobacter*), 엔테로박터 (*Enterobacter*), 살모넬라 (*Salmonella*), 에르위니아 (*Erwinia*), 판토에아 (*Pantoea*), 라넬라 (*Rahneella*), 세라티아 (*Serratia*), 제오더마토필루스 (*Geodermatophilus*), 젠마타 (*Gemmata*), 제노라브두스 (*Xenorhabdus*), 포토라브두스 (*Photorhabdus*), 아스페질러스 (*Aspergillus*), 네오사르토리아 (*Neosartorya*), 페레노포라 (*Pyrenophora*), 사카로폴리스포라 (*Saccharopolyspora*), 넥트리아 (*Nectria*), 지베렐라 (*Gibberella*), 메타리지움 (*Metarhizium*), 와들리아 (*Waddlia*), 시아노테세 (*Cyanothece*), 셀룰파가 (*Cellulphaga*), 프로비덴시아 (*Providencia*), 브라디리조비움 (*Bradyrhizobium*), 아그로박테리움 (*Agrobacterium*), 무실라기니박터 (*Mucilaginibacter*), 세라티아 (*Serratia*), 소란지움 (*Sorangium*), 스트렙토스포란지움 (*Streptosporangium*), 레니박테리움 (*Renibacterium*), 아에로모나스 (*Aeromonas*), 레이네케아 (*Reinekea*), 크로모박테리움 (*Chromobacterium*), 모리텔라 (*Moritella*), 할리안지움 (*Halangium*), 칸지엘라 (*Kangiella*), 마리노모나스 (*Marinomonas*), 비브리오날레스 (*Vibrionales*), 리스토넬라 (*Listonella*), 살리니비브리오 (*Salinivibrio*), 포토박테리움 (*Photobacterium*), 알테로모나달레스 (*Alteromonadales*), 레지오넬라 (*Legionella*), 테ред니박터 (*Teredinibacter*), 레이네케아 (*Reinekea*), 하이드로제니비르가 (*Hydrogenivirga*), 및 슈도알테로모나스 (*Pseudoalteromonas*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 속(genus)으로부터의 것이다. 일부 실시 형태에서, 써몰리신 효소 변이체는 바실러스, 제오바실러스, 알리사이클로바실러스, 락토바실러스, 엑시구오박테리움, 브레비바실러스, 파에니바실러스, 헤르페토시폰, 오세아노바실러스, 쉬와넬라, 클로스트리듐, 스타필로코쿠스, 플라보박테리움, 스티그마텔라, 믹소코쿠스, 비브리오, 메타노사르시나, 크리세오박테리움, 및 슈도알테로모나스로 이루어진 군으로부터 선택되는 속으로부터의 것이다. 일부 실시 형태에서, 써몰리신 효소는 바실러스 속으로부터의 것이다.

[0024] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 상기에 열거된 바와 같은 하나 이상의 변이체를 포함하는 세정 조성물(cleaning composition)이다. 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 과립, 분말, 고체, 바(bar), 액체, 정제(tablet), 젤, 또는 페이스트 조성물일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 세제 조성물이다. 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 세탁용 세제 조성물, 식기용 세제 조성물, 또는 경질 표면 세정 조성물이다. 일부 실시 형태에서, 식기용 세제는 손 식기세척 세제 조성물 또는 자동 식기세척 세제 조성물이다. 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 세탁용 세제 조성물이다. 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 하나 이상의 표백제를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 포스페이트가 없다. 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 포스페이트를 함유한다. 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 적어도 하나의 추가 효소를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 적어도 하나의 추가 효소는 아실 트랜스퍼라제, 알파-아밀라제, 베타-아밀라제, 알파-갈락토시다제, 아라비노시다제, 아릴 에스테라제, 베타갈락토시다제, 카라기나제, 카탈라제, 셀로비오하이드롤라제, 셀룰라제, 콘드로이티나제, 큐티나제, 엔도-베타-1, 4-글루카나제, 엔도-베타-만나나제, 에스테라제, 엑소-만나나제, 갈락타나제, 글루코아밀라제, 헤미셀룰라제, 히알루로니다제, 케라티나제, 락카제, 락타제, 리그니나제, 리파제, 리폭시게나제, 만나나제, 옥시다제, 페테이트 리아제, 펙틴 아세틸 에스테라제, 펙티나제, 펜토사나제, 페옥시다제, 페놀옥시다제, 포스파타제, 포스포리파제, 페타제, 폴리갈اكت루로나제, 프로테아제, 풀루라나제, 리덕타제, 람노갈اكت루로나제, 베타-글루카나제, 탄나제, 트랜스글루타미나제, 자일란 아세틸-에스테라제, 자일라

나제, 자일로글루카나제, 및 자일로시다제, 추가적인 메탈로프로테아제 효소, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0025] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 상기에 열거된 바와 같은 세정 조성물을 사용하는 세정 방법이다. 세정 방법은, 표면 또는 물품을, 제1항 내지 제33항 중 어느 한 항의 써몰리신 효소 변이체를 적어도 하나 포함하는 세정 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 표면 또는 물품을 상기에 제시된 세정 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 상기 표면 또는 물품을 각각 상기 세정 조성물과 접촉시키는 단계 후에 상기 표면 또는 물품을 행구는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 물품은 식기류이다. 일부 실시 형태에서, 물품은 패브릭(fabric)이다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 상기 표면 또는 물품을 상기 세정 조성물과 접촉시키는 단계 후에 상기 표면 또는 물품을 행구는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 상기 표면 또는 물품을 행군 후에 상기 표면 또는 물품을 건조하는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 상기에 제시된 세정 조성물, 및 세정을 필요로 하는 표면 또는 물품을 제공하는 단계; 및 상기 세정 조성물을, 상기 표면 또는 물품의 세정을 위해 적합한 조건 하에서, 세정을 필요로 하는 상기 표면 또는 물품과 접촉시켜 세정된 표면 또는 물품을 생성하는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 상기 세정된 표면 또는 물품을 행구어, 행궈진 표면 또는 물품을 생성하는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 상기 행궈진 표면 또는 물품을 건조하는 단계를 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 pHPLT-프로테이나제T의 플라스미드 맵을 나타낸다.

도 2a 내지 도 2c는 MEROPS 패밀리 M4의 424개 구성원의 계통수를 제공한다. 도 2a에 대해서는 X-축의 위치가 정확하지만, 도 2b 및 도 2c에 대한 X-축은 조정에 의해 이동되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명은 개선된 메탈로프로테아제 효소, 특히 세제 조성물에 유용한 효소를 제공한다. 구체적으로, 본 발명은, 모 메탈로프로테아제 효소와 비교할 때, 하나 이상의 변형, 예를 들어, 치환을 갖는 메탈로프로테아제 효소 변이체를 제공한다. 이는 세척 사이클에서 효소의 유효성을 개선하는, 세척 성능, 세제 조성물에서의 효소의 안정성, 및/또는 효소의 열 안정성의 개선에 의한 효소의 개선에 대해서 성취될 수 있다. 본 발명은, 변이체 써몰리신 메탈로프로테아제 효소를 포함하지만 이에 한정되지 않는, 변이체 메탈로프로테아제 효소를 제공하며, 이는 다양한 세정 응용들에서 특히 매우 적합하고 유용하다. 본 발명은 본 명세서에 제시된 변이체 메탈로프로테아제 효소 (예를 들어, 변이체 써몰리신) 중 적어도 하나를 포함하는 조성물을 포함한다. 일부 그러한 조성물은 세제 조성물을 포함한다. 본 발명은, 바실러스 및 제오바실러스 종을 포함하는 다양한 종의 변이체 메탈로프로테아제 효소, 및 하나 이상의 그러한 변이체 써몰리신을 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명의 메탈로프로테아제 효소 변이체는 세제 조성물에 유용한 다른 효소와 조합될 수 있다. 본 발명은 또한 본 발명의 메탈로프로테아제 효소 변이체를 사용한 세정 방법을 제공한다.

[0028] 본 발명은 모 메탈로프로테아제 효소로부터의 하나 이상의 변형을 갖는 메탈로프로테아제 효소의 효소 변이체를 포함한다. 효소 변이체는, 세척 성능, 세제 조성물에서의 효소의 안정성 및 효소의 열 안정성에 대해 최소 성능 지수를 갖는 한편 이러한 특성을 중 적어도 하나가 모 메탈로프로테아제 효소에 비해 개선됨으로써, 세제 조성물에 유용할 수 있다.

[0029] 추가적으로, 본 발명은, 적합한 변형이 세척 성능, 세제 조성물에서의 효소의 안정성 및 효소의 열 안정성에 대한 최소 성능 지수를 야기하는 한편, 이러한 특성을 중 적어도 하나가 모 메탈로프로테아제 효소에 비해 개선된 세제 조성물에 유용할 수 있는 메탈로프로테아제 효소의 하나 이상의 아미노산 위치에서, 변형, 예를 들어, 치환을 제공한다. 이들 변형은 본 발명의 변형에 적합한 것으로 간주된다. 이들 아미노산 위치는 모 메탈로프로테아제 효소에 대한 조합 변형(combinatorial modification)을 위해 유용한 위치로 간주될 수 있다. 유용한 위치인 것으로 확인된 메탈로프로테아제 효소 아미노산 위치는 세제 조성물에서의 사용에 적합한 다수의 변형을 갖는 것을 또한 특징으로 할 수 있다. 각각의 위치에 대해, 더 많은 수의 가능성 있는 적합한 변형은 특정 위치의 더 높은 생산성을 나타낸다.

[0030] 또한, 본 발명은 이들 메탈로프로테아제 변이체를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명은 이들 메탈로프로테아제 변이체 중 적어도 하나를 포함하는 세정 조성물을 제공한다.

[0031] 명료함을 위해, 개별적인 실시 형태들과 관련하여 상기 및 하기에 기재된, 본 발명의 이들 소정 특징부는 또한

단일 실시 형태에서 조합으로 제공될 수 있다. 역으로, 간결함을 위해, 단일 실시 형태와 관련하여 기재된, 본 발명의 다양한 특징부는 또한 개별적으로 또는 임의의 하위 조합으로 제공될 수 있다.

정의

[0032] 달리 표시되지 않는다면, 본 발명의 실시는 분자 생물학, 단백질 공학, 미생물학, 및 재조합 DNA에서 보통 사용되는 종래 기술을 포함하며, 이는 당업자에게 이해된다. 그러한 기술은 당업자에게 공지되어 있으며, 당업자에게 공지되어 있는 수많은 교과서 및 참고 자료에 기재되어 있다. 본 명세서에서 상기 및 하기 둘 모두에 언급된 모든 특허, 특히 출원, 논문, 및 간행물은 본 명세서에 명백하게 참고로 포함된다.

[0034] 본 명세서에서 달리 정의되지 않으면, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 다수의 기술 사전이 당업자에게 공지되어 있다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 실시에서 사용되지만, 일부 적합한 방법 및 재료가 본 명세서에 기술된다. 따라서, 바로 이하에 정의된 용어는 전체로서 명세서에 대한 참조로서 더욱 충분하게 기술된다. 또한, 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 단수형 "하나의(a, an)", 및 "상기(the)"는, 문맥에 정확하게 달리 표시되지 않는 한, 복수의 지시대상을 포함한다. 수치 범위는 범위를 정하는 수를 포함한다. 달리 표시되지 않는다면, 핵산은 5'에서 3' 배향으로 좌측에서 우측으로 기재되고; 아미노산 서열은 각각 아미노에서 카르복시 배향으로 좌측에서 우측으로 기재된다. 본 발명은 기술된 특정 방법론, 프로토콜 및 시약이 당업자에 의해 사용되는 문맥에 따라 달라질 수 있기 때문에, 이들에 제한되지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0035] 본 발명의 실시는, 달리 언급되지 않는다면, 단백질 정제, 분자 생물학, 미생물학, 재조합 DNA 기술 및 단백질 서열화의 종래 기술을 이용하며, 이들 모두는 당업자에게 이해된다.

[0036] 게다가, 본 명세서에서 제공되는 표제는 본 발명의 다양한 태양 또는 실시 형태를 제한하는 것이 아니며, 이들은 전체적으로 본 명세서를 참조할 수 있다. 따라서, 바로 이하에 정의된 용어들은 전체적으로 본 명세서를 참조하여 더욱 충분하게 정의된다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 이해를 용이하게 하기 위해, 다수의 용어가 하기로 정의되어 있다.

[0037] 본 명세서 전체에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은, 더 낮은 수치 제한이 본 명세서에 명확히 기재되어 있는 것처럼, 모든 그러한 더 낮은 수치 제한을 포함하는 것으로 의도된다. 본 명세서 전체에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은, 더 높은 수치 제한이 본 명세서에 명확히 기재되어 있는 것처럼, 모든 그러한 더 높은 수치 제한을 포함할 것이다. 본 명세서 전체에 걸쳐 주어진 모든 수치 범위는, 더 좁은 수치 범위가 본 명세서에 명확히 기재되어 있는 것처럼, 그러한 더 넓은 수치 범위 내에 있는 모든 그러한 더 좁은 수치 범위를 포함할 것이다.

[0038] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "프로테아제" 및 "프로테이나제"는 다른 단백질을 분해할 수 있는 효소 단백질을 지칭한다. 프로테아제는, 단백질을 형성하는 웨프티드 또는 폴리웨프티드 사슬에서 아미노산들을 함께 연결하는 웨프티드 결합의 가수분해에 의해 단백질 이화작용을 시작하는 "단백질 분해"를 수행하는 능력을 갖는다. 단백질-소화 효소로서의 프로테아제의 활성은 "단백질 분해 활성"으로 지칭된다. 단백질 분해 활성을 측정하기 위한 다수의 공지된 절차가 존재한다 (예를 들어, 문헌[Kalisz, "Microbial Proteinases," In: Fiechter (ed.), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, (1988)] 참조). 예를 들어, 단백질 분해 활성은, 각각의 프로테아제가 시판 기질을 가수분해하는 능력을 분석하는 비교 검정법에 의해 평가될 수 있다. 프로테아제 또는 단백질 분해 활성의 분석에 유용한 예시적인 기질에는, 다이-메틸 카세인 (시그마(Sigma) C-9801), 소 콜라겐 (시그마 C-9879), 소 엘라스틴 (시그마 E-1625), 및 소 캐라틴 (아이씨엔 바이오메디칼(ICN Biomedical) 902111)이 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 이러한 기질을 이용하는 비색 검정법이 본 기술 분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 국제특허 공개 WO 99/34011호 및 미국 특허 제6,376,450호 참조, 이들 둘 모두는 본 명세서에 참고로 포함됨). pNA 검정법 (예를 들어, 문헌[Dei Mar *et al.*, *Anal. Biochem.* 99:316-320 [1979]] 참조)이 구배 유리 동안 수집된 분획들에 대한 활성 효소 농도를 결정하는 데에 또한 사용된다. 이 검정법은, 효소가 용해성 합성 기질, 석시닐-알라닌-알라닌-프롤린-페닐알라닌-p-니트로아닐리드 (suc-AAPF-pNA)를 가수분해할 때 p-니트로아닐린이 방출되는 속도를 측정한다. 가수분해 반응으로 인한 황색의 생성 속도를 분광광도계에서 410 nm에서 측정하며, 활성 효소 농도에 비례한다. 또한, 280 나노미터 (nm)에서의 흡광도 측정을 사용하여 총 단백질 농도를 결정할 수 있다. 활성 효소/총 단백질 비는 효소 순도를 제공한다.

[0039] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "써몰리신"은 MEROPS - 웨프티다제 데이터 베이스 (문헌[Rawlings *et al.*,

MEROPS: the peptidase database, Nucl Acids Res, 34 Database issue, D270-272 [2006]] 참조)에 기재된 바와 같은 M4 프로테아제 패밀리의 임의의 구성원을 지칭하며, 그의 써몰리신 (TLN; EC 3.4.24.27)이 프로토타입이다. 바실러스 써모프로테올리티쿠스(*Bacillus thermoproteolyticus*)로부터 분비되는 써몰리신, (EC 3.4.24.27) 중성 메탈로 엔도-펩티다제의 아미노산 서열은 티타니(Titani) 등에 의해 최초로 보고되었다 (문헌 [Titani *et al.*, (1972), Amino-acid sequence of thermolysin. *Nature New Biol.* 238:35-37]). 후속적으로, 이러한 효소의 유전자가 오도노휴 (O'Donohue) 등에 의해 클로닝되었으며 (문헌 [O'Donohue, M.J (1994) Cloning and expression in *Bacillus subtilis* of the npr gene from *Bacillus thermoproteolyticus* Rokko coding for the thermostable metalloprotease thermolysin. *Biochem. J.* 300:599-603]), 서열은 UniProtKB/Swiss-Prot 수탁 번호 P00800로서 제시되었다 (서열 번호 4). 티타니 등에 의해 보고된 단백질 서열과 오도노휴 등에 의해 보고된 단백질 서열 사이의 유일한 차이는 위치 37에서의 (Asp 대신) Asn 및 위치 119에서의 (Glu 대신) Gln의 확인이다. 따라서, 용어 "써몰리신", "스테아로리신", "바실로리신", "프로테이나제-T", "PrT", "써몰리신-유사 프로테아제", 및 "TLP"는 본 명세서에서 바실러스 써모프로테올리티쿠스의 중성 메탈로프로테아제 효소를 지칭하는 데에 호환가능하게 사용된다.

[0040] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "변이체 폴리펩티드"는 (야생형 폴리펩티드를 포함하지만 이에 한정되지 않는) 모 또는 참고 폴리펩티드의 아미노산 서열과는 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다.

[0041] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "바실러스 속"은, 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*), 바실러스 리체니포르미스(*B. licheniformis*), 바실러스 렌투스(*B. lentus*), 바실러스 브레비스(*B. brevis*), 바실러스 스테아로써모필루스(*B. stearothermophilus*), 바실러스 알칼로필루스(*B. alkalophilus*), 바실러스 아밀로리퀴파시엔스(*B. amyloliquefaciens*), 바실러스 클라우시(*B. clausii*), 바실러스 할로두란스(*B. halodurans*), 바실러스 메가테리움(*B. megaterium*), 바실러스 코아글란스(*B. coagulans*), 바실러스 서큘란스(*B. circulans*), 바실러스 라우투스(*B. lautus*), 및 (바실러스 써린지엔시스(*B. thuringiensis*)를 포함하지만 이에 한정되지 않는, 당업자에게 공지된 바와 같은 "바실러스" 속에 속하는 모든 종을 포함한다. 바실러스 속은 분류체계 개편을 계속 겪는 것으로 인식된다. 따라서, 상기 속은, 이제는 "제오바실러스 스테아로써모필루스"로 명명되는 바실러스 스테아로써모필루스와 같은 유기체를 포함하지만 이에 한정되지 않는, 재분류된 종을 포함하는 것으로 의도된다. 산소의 존재 하에서의 저항성 내생포자의 생산은 바실러스 속의 결정적인 특징으로 고려되지만, 이러한 특징은 또한 최근에 명명된 알리사이클로바실러스 (*Alicyclobacillus*), 암피바실러스 (*Amphibacillus*), 아뉴리니바실러스 (*Aneurinibacillus*), 아녹시바실러스 (*Anoxybacillus*), 브레비바실러스 (*Brevibacillus*), 필로바실러스 (*Filobacillus*), 그라실리바실러스 (*Gracilibacillus*), 할로바실러스 (*Halobacillus*), 파에니바실러스 (*Paenibacillus*), 살리바실러스 (*Salibacillus*), 써모바실러스 (*Thermobacillus*), 유레이바실러스 (*Ureibacillus*) 및 비르기바실러스 (*Virgibacillus*)에도 적용된다.

[0042] 본 명세서에서 호환가능하게 사용되는, 용어 "폴리뉴클레오티드" 및 "핵산"은 사슬로 공유결합된 임의의 길이의 뉴클레오티드 단량체들의 중합체를 지칭한다. 데옥시리보뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드인 DNA (데옥시리보핵산), 및 리보뉴클레오티드의 중합체인 RNA (리보핵산)가, 별개의 생물학적 기능을 갖는 폴리뉴클레오티드 또는 핵산의 예이다. 폴리뉴클레오티드 또는 핵산에는, 단일 가닥, 이중 가닥 또는 삼중 가닥 DNA, 유전체 DNA, cDNA, RNA, DNA-RNA 하이브리드, 또는 퓨린 및 퍼리미딘 염기를 포함하는 중합체, 또는 기타 중성의, 화학적으로, 생화학적으로 변형된, 비-중성의, 또는 유래된 뉴클레오티드 염기가 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 하기는 폴리뉴클레오티드의 비제한적인 예이다: 유전자, 유전자 단편, 염색체 단편, 발현된 서열 태그 (EST), 엑손, 인트론, 메신저 RNA (mRNA), 전달 RNA (tRNA), 리보솜 RNA (rRNA), 리보자임, 상보적 DNA (cDNA), 재조합 폴리뉴클레오티드, 분지형 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 단리된 DNA, 임의의 서열의 단리된 RNA, 핵산 탐침, 및 프라이머.

[0043] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "돌연변이"는 참고 아미노산 또는 핵산 서열에 대해 이루어지는 변화를 지칭한다. 이 용어는 치환, 삽입 및 결실을 포함하는 것으로 의도된다.

[0044] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "벡터"는 핵산(들)을 표적 세포 또는 조직 내로 도입하거나 전달하는 데 사용되는 핵산 작제물(construct)을 지칭한다. 벡터는 전형적으로 외래 DNA를 세포 또는 조직 내로 도입하는 데 사용된다. 벡터에는 플라스미드, 클로닝 벡터, 박테리오파지, 바이러스 (예를 들어, 바이러스 벡터), 코스미드, 발현 벡터, 셔틀 벡터 등이 포함된다. 벡터는 전형적으로 복제 기점, 멀티클로닝 부위, 및 선택 마커를 포함한다. 벡터를 표적 세포에 삽입하는 프로세스는 전형적으로 형질전환으로 지칭된다. 본 발명은, 일부 실시 형태에서, 적합한 숙주에서의 DNA 서열의 발현 및 재조합 폴리펩티드 사슬의 폴딩(folding) 및 전좌를 달성

할 수 있는 적합한 프로서열(prosequence) (예를 들어, 분비성, 신호 웨პ티드 서열 등)에 작동가능하게 연결되는 메탈로프로테아제 폴리펩티드 (예를 들어, 전구 또는 성숙 메탈로프로테아제 폴리펩티드)를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 벡터를 포함한다.

[0045] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "발현 카세트", "발현 플라스미드" 또는 "발현 벡터"는 표적 세포에서의 관심 핵산의 발현을 위해 재조합적으로 또는 합성에 의해 생성되는 핵산 작제물 또는 벡터를 지칭한다. 발현 벡터 또는 발현 카세트는 전형적으로 외래 핵산이 발현되게 하는 프로모터 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 발현 벡터 또는 카세트는 또한 전형적으로 표적 세포에서 특정 핵산의 전사를 가능하게 하는 임의의 다른 특정된 핵산 요소를 포함한다. 재조합 발현 카세트는 플라스미드, 염색체, 미토콘드리아 DNA, 색소체 DNA, 바이러스, 또는 핵산 단편 내로 포함될 수 있다. 다수의 원핵성 및 진핵성 발현 벡터가 구매가능하다.

[0046] 일부 실시 형태에서는, 서열의 말단들이 폐쇄되어 DNA 작제물이 폐쇄된 원을 형성한다. 본 기술 분야에 공지된 기술을 사용하여, DNA 작제물 내로 포함될 수 있는, 관심 핵산 서열은 야생형, 돌연변이형, 또는 변형 핵산이다. 일부 실시 형태에서, DNA 작제물은 숙주 세포 염색체와 상동인 하나 이상의 핵산 서열을 포함한다. 다른 실시 형태에서, DNA 작제물은 하나 이상의 비상동성 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일단 시험관 내에서 (*in vitro*) DNA 작제물이 조립되면, 이는, 예를 들어, 1) 이종 서열을 숙주 세포의 원하는 표적 서열 내로 삽입하고/하거나; 2) 숙주 세포 염색체의 소정 영역을 돌연변이화 (즉, 내인성 서열을 이종 서열로 대체)하고/하거나; 3) 표적 유전자를 결실시키고/시키거나; 4) 복제 플라스미드를 숙주 내로 도입하는 데에 사용될 수 있다. "DNA 작제물"은 본 명세서에서 "발현 카세트"와 호환가능하게 사용된다.

[0047] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "플라스미드"는 염색체 DNA로부터 독립적으로 복제할 수 있는 염색체 외 DNA 분자를 지칭한다. 플라스미드는 이중 가닥(ds)이며, 원형일 수 있고, 전형적으로 클로닝 벡터로서 사용된다.

[0048] 세포 내로 핵산 서열을 도입하는 문맥에서 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "도입"은 세포 내로 핵산 서열을 전달하기에 적합한 임의의 방법을 지칭한다. 그러한 도입 방법에는 원형질체 융합, 형질주입, 형질전환, 전기천공, 접합, 및 형질도입이 포함되지만 이에 한정되지 않는다 (예를 들어, 문헌[Ferrari *et al.*, "Genetics," in Hardwood *et al.* (eds.), *Bacillus*, Plenum Publishing Corp., pp. 57-72 [1989]] 참조).

[0049] 형질전환은 유전 물질 (예를 들어, DNA)의 흡수, 선택적인 유전체 포함, 및 발현으로부터 기인하는, 세포의 유전자적 변화를 지칭한다.

[0050] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 놓일 때 다른 핵산 서열과 "작동가능하게 연결된다". 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서는, 그러한 프로모터가 뉴클레오티드 코딩 서열의 전사를 영향을 준다면, 그러한 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 리보솜 결합 부위는, 코딩 서열의 번역을 용이하게 하도록 위치된다면, 그러한 코딩 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. 전형적으로, "작동가능하게 연결된" DNA 서열들은 인접해 있다. 그러나, 인핸서는 인접해 있을 필요가 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서의 라이게이션(ligation)에 의해 성취된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 종래의 관행에 따라 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 링커(linker)가 사용될 수 있다.

[0051] 본 명세서에 사용되는 바와 같이 용어 "유전자"는, 폴리펩티드를 암호화하며 개별 코딩 세그먼트들 (엑손들) 사이의 개재 서열들 (인트론들)뿐만 아니라 코딩 영역들 전후의 영역들을 포함하는, 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, DNA 세그먼트)를 지칭한다.

[0052] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "재조합"은, 세포와 관련하여 사용될 때, 전형적으로 세포가 외래 핵산 서열의 도입에 의해 변형되었거나 세포가 그렇게 변형된 세포로부터 유래됨을 나타낸다. 예를 들어, 재조합 세포는 천연(native) (비-재조합) 형태의 세포 내에서는 동일한 형태로 발견되지 않는 유전자를 포함할 수 있거나, 또는 재조합 세포는 (천연 형태의 세포에서 발견되는) 천연 유전자를 포함할 수 있지만, 그러나 이러한 유전자는 변형되어 세포 내로 재도입된 것이다. 재조합 세포는, 세포로부터의 핵산의 제거 없이, 변형된 세포에 내재하는 핵산을 포함할 수 있으며; 그러한 변형은 유전자 치환, 부위-특이적 돌연변이, 및 당업자에게 공지된 관련 기술에 의해 얻어지는 것들을 포함한다. 재조합 DNA 기술은, 시험관 내에서 재조합 DNA를 생산하고, 그러한 재조합 DNA를 발현 또는 전파될 수 있는 세포 내로 전달하여 재조합 폴리펩티드를 생산하는 기술을 포함한다. 폴리뉴클레오티드 또는 핵산의 "재조합", "재조합하는", 및 "재조합된"은 일반적으로, 둘 이상의 핵산 또는 폴리뉴클레오티드 가닥들 또는 단편들을 조립 또는 조합하여 새로운 폴리뉴클레오티드 또는 핵산을 생성하는 것을 지칭한다. 재조합 폴리뉴클레오티드 또는 핵산은 때때로 키메라로 지칭된다. 핵산 또는 폴리펩티드는, 인공적이거나 또는 엔지니어링된 경우에, "재조합" 핵산 또는 폴리펩티드이다.

[0053]

본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 '핵산' 또는 '유전자' "증폭"은, 특정 DNA 서열이 불균형하게 복제되어, 증폭된 핵산 또는 유전자가 초기에 게놈에 존재하는 것보다 더 큰 복제수(copy number)로 존재하게 되는 프로세스를 지칭한다. 일부 실시 형태에서, 약물(예를 들어, 저해가능한 효소의 저해제)의 존재 하에서의 성장에 의한 세포의 선별은, 약물의 존재 하에서의 성장을 위해 필요한 유전자 산물을 암호화하는 내인성 유전자의 증폭, 또는 이러한 핵산 또는 유전자 산물을 모두를 암호화하는 외인성(즉, 투입) 서열의 증폭 중 어느 하나를 가져온다.

[0054]

"증폭"은 템플릿 특이성(template specificity)을 수반하는 특별한 경우의 핵산 복제이다. 이것은 비특이적 템플릿 복제(즉, 템플릿-의존성이지만 특정 템플릿에 의존적이지는 않은 복제)와는 대조를 이루는 것이다. 템플릿 특이성은 본 명세서에서 복제 충실성(fidelity of replication)(즉, 알맞은 폴리뉴클레오티드 서열의 합성) 및 뉴클레오티드(리보- 또는 데옥시리보-) 특이성과는 구별된다. 템플릿 특이성은 종종 "표적" 특이성의 면에서 설명된다. 표적 서열은 다른 핵산으로부터 가려내고자 한다는 의미에서 "표적"이다. 증폭 기술은 주로 이러한 가려내기를 위해 설계되었다.

[0055]

본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "프라이머"는, 정제된 제한 소화물에서와 같이 자연적으로 발생하든 또는 합성에 의해 생성되든, 핵산 가닥에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건 하에(즉, 뉴클레오티드 및 유도제, 예를 들어, DNA 폴리머라제의 존재 하에 그리고 적합한 온도 및 pH에) 놓여진 경우 합성의 개시점으로서 작용할 수 있는 올리고뉴클레오티드(뉴클레오티드 잔기들의 중합체)를 지칭한다. 프라이머는 바람직하게는 증폭의 최대 효율을 위해서는 단일 가닥이지만, 대안적으로 이중 가닥일 수 있다. 이중 가닥인 경우, 프라이머는 그의 가닥들을 분리하도록 우선 처리된 후에, 연장 산물을 제조하는 데 사용된다. 일부 실시 형태에서, 프라이머는 올리고데옥시리보뉴클레오티드이다. 프라이머는 유도제의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍하기에 충분히 길어야 한다. 프라이머의 정확한 길이는, 온도, 프라이머의 공급원, 및 방법의 사용을 포함하는 다양한 요인에 따라 좌우된다.

[0056]

본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "탐침"은, 정제된 제한 소화물에서와 같이 자연적으로 발생하든 또는 합성에 의해, 재조합적으로 또는 PCR 증폭에 의해 생성되든, 전형적으로 다른 관심 올리고뉴클레오티드에 혼성화될 수 있는 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 탐침은 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있다. 탐침은 특정 유전자 서열의 검출, 동정(identification), 및 단리에 유용하다. 본 발명에 사용되는 임의의 탐침은, 효소(예를 들어, ELISA뿐만 아니라 효소-기반 조직화학적 검정법), 형광, 방사성, 및 발광 시스템을 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 검출 시스템에서 검출가능하도록, 임의의 "리포터 분자"로 표지될 것으로 고려된다. 본 발명은 임의의 특정 검출 시스템 또는 표지에 제한되는 것으로 의도되지 않는다.

[0057]

본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "표적"은, 폴리머라제 연쇄 반응과 관련하여 사용될 때, 폴리머라제 연쇄 반응을 위해 사용되는 프라이머에 의해 결합되는 핵산의 영역을 지칭한다. 따라서, "표적"은 다른 핵산 서열로부터 가려내고자 하는 것이다. 뉴클레오티드 "세그먼트"는 표적 핵산 서열 내의 핵산의 영역이다.

[0058]

본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "폴리머라제 연쇄 반응"(PCR)은, 본 명세서에 참고로 포함된, 미국 특허 제4,683,195호, 제4,683,202호, 및 제4,965,188호의 방법을 지칭하는데, 클로닝 또는 정제 없이 유전체 DNA의 혼합물에서 표적 서열의 세그먼트의 농도를 증가시키는 방법을 포함한다. 표적 서열을 증폭하기 위한 이러한 프로세스는 본 기술 분야에 공지되어 있다.

[0059]

본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "증폭 시약"은 프라이머, 핵산 템플릿, 및 증폭 효소 이외에 증폭에 필요한 그러한 시약(예를 들어, 데옥시리보뉴클레오티드 트라이포스페이트, 완충제 등)을 지칭한다. 전형적으로, 증폭 시약은 다른 반응 성분들과 함께 반응 용기(시험관, 마이크로웰 등) 내에 넣어져 수용된다.

[0060]

본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "제한 엔도뉴클레아제" 또는 "제한 효소"는 제한 부위로서 알려진 뉴클레오티드의 특이적 서열에서 또는 그 근처에서 이중-가닥 또는 단일-가닥 DNA를 절단할 수 있는 효소(예를 들어, 박테리아 효소)를 지칭한다. 제한 부위를 포함하는 뉴클레오티드 서열은, 주어진 제한 엔도뉴클레아제 또는 제한 효소에 의해 인식되고 절단되며, 종종, DNA 단편의 삽입을 위한 부위이다. 제한 부위는 밸런 백터 또는 DNA 작제물 내로 엔지니어링될 수 있다.

[0061]

"상동성 재조합"은, 동일하거나 거의 동일한 뉴클레오티드 서열의 부위에서의, 2개의 DNA 분자 또는 짹을 이룬 염색체 사이의 DNA 단편의 교환을 지칭한다. 일부 실시 형태에서, 염색체 통합(chromosomal integration)이 상동성 재조합이다.

[0062]

핵산 또는 폴리뉴클레오티드는, 그의 천연 상태에서 또는 당업자에게 공지된 방법에 의해 조작될 때, 폴리펩티

드 또는 그의 단편을 생산하도록 전사되고/되거나 번역될 수 있다면, 폴리펩티드를 "암호화"한다고 언급된다. 그러한 핵산의 안티-센스(anti-sense) 가닥이 또한 서열을 암호화한다고 언급된다.

[0063] "숙주 균주" 또는 "숙주 세포"는 관심 DNA 서열을 포함하는 발현 벡터에 적합한 숙주를 지칭한다.

[0064] "단백질" 또는 "폴리펩티드"는 아미노산 잔기의 중합체 서열을 포함한다. 용어 "단백질" 및 "폴리펩티드"는 본 명세서에서 호환가능하게 사용된다. 생화학 명명에 대한 IUPAC-IUB 연합 위원회(IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature(JCBN))에 따라 정의된 바와 같은 아미노산에 대한 단일 및 세 자리 코드가 본 명세서 전반에서 사용된다. 단일 문자 X는 20가지 아미노산 중 임의의 것을 지칭한다. 폴리펩티드가 유전 코드의 퇴행으로 인해 하나 초과의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩될 수 있다는 것이 또한 이해된다. 돌연변이는 모 아미노산에 대한 한 자리 코드와 그 뒤에, 위치 번호 및 이어서 변이 아미노산에 대한 한 자리 코드에 의해 명명될 수 있다. 예를 들어, 위치 87에서의 글리신 (G)을 세린 (S)으로 돌연변이화하는 것은 "G087S" 또는 "G87S"로 나타낸다. 돌연변이는 아미노산에 대한 세 자리 코드 후에 N-말단으로부터 계수된 폴리펩티드 사슬에서 그의 위치를 사용하여 명명될 수 있는데, 예를 들어, 위치 10에서의 알라닌의 경우 Ala10이다. 다중 돌연변이는 돌연변이들 사이에 "-"를 삽입함으로써 표시된다. 위치 87 및 위치 90에서의 돌연변이는 "G087S-A090Y" 또는 "G87S-A90Y" 또는 "G87S + A90Y" 또는 "G087S + A090Y"로 나타낸다. 결실의 경우, 한 자리 코드 "Z"를 사용한다. 모 서열에 대한 삽입의 경우, 한 자리 코드 "Z"가 위치 번호의 왼쪽에 있다. 결실의 경우, 한 자리 코드 "Z"가 위치 번호의 오른쪽에 있다. 삽입의 경우, 위치 번호는 삽입된 아미노산(들) 이전의 위치번호에, 각각의 아미노산에 대한 0.01을 더한 것이다. 예를 들어, 위치 87과 위치 88 사이의 3개의 아미노산, 알라닌 (A), 세린 (S) 및 타이로신 (Y)의 삽입은 "Z087.01A-Z087.02S-Z087.03Y"로 표시된다. 따라서, 상기 돌연변이를 모두에 더하여 위치 100에서의 결실을 조합한 것은: "G087S-Z087.01A-Z087.02S-Z087.03Y-A090Y-A100Z"이다. 변형을 기재할 때, 위치 다음에 팔호 내에 열거된 아미노산은, 열거된 아미노산들 중 임의의 것에 의한 그 위치에서의 치환의 목록을 나타낸다. 예를 들어, 6(L,I)은 위치 6이 류신 또는 아이소류신에 의해 치환될 수 있음을 의미한다.

[0065] "프로서열" 또는 "프로펩티드 서열"은, 프로테아제의 적절한 풀딩 및 분비를 위해 필요한, 신호 펩티드 서열과 성숙 프로테아제 서열 사이의 아미노산 서열을 지칭하며; 때때로 분자내 샤프론(intramolecular chaperone)으로서 지칭된다. 프로서열 또는 프로펩티드 서열의 절단은 성숙 활성 프로테아제를 야기한다. 박테리아 메탈로프로테아제는 종종 프로-효소로서 발현된다.

[0066] 용어 "신호 서열" 또는 "신호 펩티드"는, 성숙 또는 전구 형태의 단백질의 분비 또는 직접적인 수송에 참여할 수 있는 아미노산 잔기의 서열을 지칭한다. 신호 서열은 전형적으로 전구 또는 성숙 단백질 서열의 N-말단에 위치한다. 신호 서열은 내인성 또는 외인성일 수 있다. 신호 서열은 성숙 단백질에는 보통 부재한다. 신호 서열은 전형적으로, 단백질이 수송된 후에 신호 펩티다제에 의해 단백질로부터 절단된다.

[0067] 용어 "성숙" 형태의 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드는 신호 펩티드 서열 및 프로펩티드 서열이 없는 기능적 형태의 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드를 지칭한다.

[0068] 용어 "전구" 형태의 단백질 또는 펩티드는 단백질의 아미노 또는 카르보닐 말단에 작동가능하게 연결된 프로서열을 갖는 성숙 형태의 단백질을 지칭한다. 전구체는 또한 프로서열의 아미노 말단에 작동가능하게 연결된 "신호" 서열을 가질 수 있다. 전구체는, 번역 후 활성에 관련된 추가적인 폴리펩티드(예를 들어, 그로부터 성숙 형태의 단백질 또는 펩티드를 남기도록 절단되는 폴리펩티드)를 또한 가질 수 있다.

[0069] 아미노산 서열 또는 핵산 서열과 관련하여 용어 "야생형"은 아미노산 서열 또는 핵산 서열이 천연 서열 또는 자연적으로 발생하는 서열임을 나타낸다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "자연적으로 발생하는"은 자연에서 발견되는 어떤 것 (예를 들어, 단백질, 아미노산, 또는 핵산 서열)을 지칭한다.

[0070] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "비자연적으로 발생하는"은, 야생형 서열의 변형으로서, 자연에서 발견되지 않는 어떤 것 (예를 들어, 실험실에서 생산되는 재조합 핵산 및 단백질 서열)을 지칭한다.

[0071] 아미노산 잔기 위치와 관련하여 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "~에 대응하는" 또는 "~에 대응한다" 또는 "대응한다"는 단백질 또는 펩티드 내의 열거된 위치에서의 아미노산 잔기, 또는 단백질 또는 펩티드 내의 열거된 잔기와 유사하거나, 상동이거나, 또는 동등한 아미노산 잔기를 지칭한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "대응하는 영역"은 일반적으로 관련 단백질 또는 참고 단백질의 유사한 위치를 지칭한다.

[0072] 용어 "~로부터 유래된" 및 "~로부터 얻어진"은 문제의 유기체의 균주에 의해 생산되거나 생산가능한 단백질뿐만 아니라, 그러한 균주로부터 단리된 DNA 서열에 의해 암호화되고 그러한 DNA 서열을 함유하는 숙주 유기체에서

생산되는 단백질을 지칭한다. 추가적으로, 상기 용어는 합성 및/또는 cDNA 기원의 DNA 서열에 의해 암호화되고 문제의 단백질의 식별 특성을 갖는 단백질을 지칭한다. 예를 들어, "바실러스로부터 유래된 프로테아제"는 바실러스에 의해 자연적으로 생성된 단백질 분해 활성을 갖는 그러한 효소뿐만 아니라, 바실러스 공급원에 의해 생성되지만 유전자 공학 기술의 사용을 통해 세린 프로테아제를 암호화하는 핵산에 의해 형질전환된 비-바실러스 유기체에 의해 생성되는 것과 같은 세린 프로테아제를 지칭한다.

[0073] 2개의 핵산 또는 폴리펩티드 서열의 문맥에서 용어 "동일한"은, 하기 서열 비교 또는 분석 알고리즘 중 하나를 사용하여 측정되는 바와 같이, 최대 대응성으로 정렬되었을 때 두 서열 내의 잔기가 동일함을 지칭한다.

[0074] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "상동 유전자"는, 서로 대응하며 서로 동일하거나 매우 유사한, 상이하지만 보통 관련된 종으로부터의 한 쌍의 유전자를 지칭한다. 이 용어는 종분화 (즉, 새로운 종의 발현)에 의해 분리된 유전자 (예를 들어, 병렬상동성(orthologous) 유전자)뿐만 아니라, 유전자 중복에 의해 분리된 유전자 (예를 들어, 직렬상동성(paralogous) 유전자)를 포함한다.

[0075] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "% 동일성 또는 퍼센트 동일성"은 서열 유사성을 지칭한다. 퍼센트 동일성은 본 기술 분야에 공지된 표준 기술을 사용하여 결정될 수 있다 (예를 들어, 문헌[Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 [1981]; Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 [1970]]; 문헌[Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 [1988]]; 위스콘신 제네티克斯 소프트웨어 팩키지(Wisconsin Genetics Software Package)(미국 위스콘신주, 매디슨 소재의 제네티克斯 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group))의 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA와 같은 소프트웨어 프로그램; 및 문헌[Devereux *et al.*, Nucl. Acid Res. 12:387-395 [1984] 참조). 유용한 알고리즘의 하나의 예는 PILEUP이다. PILEUP는 진행적, 쌍 방식 정렬을 사용하여 관련 서열 그룹으로부터 다중 서열 정렬을 작성한다. 이것은 또한 정렬을 작성하는데 사용된 클러스터링 관계를 보여주는 계도를 그릴 수 있다. PILEUP는 펑(Feng) 및 두리틀(Doolittle)의 진행적 정렬 방법의 단순화를 사용한다(문헌[Feng and Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360 [1987]] 참조). 상기 방법은 히긴스(Higgins) 및 샤프(Sharp)에 의해 기술된 방법과 유사하다 (문헌[Higgins and Sharp, CABIOS 5:151-153 [1989]] 참조). 유용한 PILEUP 파라미터는 3.00의 디폴트 갭 가중(default gap weight), 0.10의 디폴트 갭 길이 가중, 및 가중된 말단 갭을 포함한다. 다른 유용한 알고리즘은 알트슐(Altschul) 등에 의해 기술된 BLAST 알고리즘이다 (문헌[Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410 [1990]; 및 문헌[Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 [1993]] 참조). BLAST 프로그램은 다수의 검색 파라미터를 사용하는데, 그 중 대부분은 디폴트 값으로 설정된다.

[0076] NCBI BLAST 알고리즘은 생물학적 유사성 면에서 가장 관련된 서열을 찾지만, 20개 미만의 잔기의 쿼리 서열 (query sequence)에 대해서는 권장되지 않는다 (문헌[Altschul, SF *et al.* (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402] 및 문헌[Schaffer, AA *et al.* (2001) Nucleic Acids Res. 29:2994-3005]). 핵산 서열 검색을 위한 디폴트 BLAST 파라미터의 예는 다음과 같다:

[0077] • 이웃 단어 임계치(Neighboring words threshold): 11

[0078] • E - 값 컷오프(cutoff): 10

[0079] • 스코어링 매트릭스(Scoring Matrix): NUC.3.1 (매치(match) = 1, 미스매치(mismatch) = - 3)

[0080] • 갭 오픈(Gap Opening): 5

[0081] • 갭 확장(Gap Extension): 2

[0082] • 그리고, 아미노산 서열 검색을 위한 파라미터는 하기와 같다:

[0083] • 단어 크기: 3

[0084] • E - 값 컷오프: 10

[0085] • 스코어링 매트릭스 : BLOSUM62

[0086] • 갭 오픈 : 11

[0087] • 캡 확장 : 1

[0088] 퍼센트 (%) 아미노산 서열 동일성 값은, 매치하는 동일한 잔기의 수를, 최적/최대 정렬을 위한 프로그램에 의해 작성된 임의의 캡을 포함하는 "참고" 서열의 잔기의 총 수로 나누어서 결정한다. 서열이 서열 번호 A와 90% 동일하다고 하는 경우, 서열 번호 A는 "참고" 서열이다. BLAST 알고리즘은 "참고" 서열을 "쿼리" 서열이라고 지칭한다.

[0089] 서열 정렬 알고리즘의 다른 예는 CLUSTAL W 알고리즘이다. 문헌[Thompson *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680]을 참조한다. CLUSTAL W 알고리즘에 대한 디폴트 파라미터는 다음과 같다:

캡 오프닝 패널티:	10.0
캡 확장 패널티:	0.05
단백질 중량 매트릭스:	BLOSUM 시리즈
DNA 중량 매트릭스:	IUB
지연 발산 서열(Delay divergent sequence) %:	40
캡 분리 거리:	8
DNA 전이 가중:	0.50
친수성 잔기 목록:	GPSNDQEKR
네거티브 매트릭스 사용:	오프
잔기 특이적 패널티 토클(toggle):	온
친수성 패널티 토클:	온
말단 캡 분리 패널티 토클	오프.

[0090]

[0091] CLUSTAL 알고리즘에서는, 어느 한 말단에서 일어나는 결실이 포함된다. 예를 들어, 500개의 아미노산의 폴리펩티드의 어느 한 말단에서 (또는 폴리펩티드 내에) 5개의 아미노산 결실을 갖는 변이체는 "참고" 폴리펩티드에 대해 99% (495/500 동일 잔기 × 100)의 퍼센트 서열 동일성을 가질 것이다. 그러한 변이체는 상기 폴리펩티드에 대해 "99% 이상의 서열 동일성"을 갖는 변이체에 포함될 것이다.

[0092] 관심 폴리펩티드가 참고 폴리펩티드의 아미노산 서열에 대해 약 60% 이상, 약 65% 이상, 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 또는 약 99.5% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 경우, 관심 폴리펩티드는 참고 폴리펩티드에 대해 "실질적으로 동일하다"고 말할 수 있다. 2개의 그러한 폴리펩티드 사이의 퍼센트 동일성은 최적으로 정렬된 2개의 폴리펩티드 서열의 검사에 의해 수동으로, 또는 표준 파라미터를 사용하는 소프트웨어 프로그램 또는 알고리즘 (예를 들어, BLAST, ALIGN, CLUSTAL)을 사용하여 결정될 수 있다. 2개의 폴리펩티드가 실질적으로 동일하다는 하나의 지표는 첫 번째 폴리펩티드가 두 번째 폴리펩티드와 면역학적으로 교차-반응성인 것이다. 전형적으로, 보존적 아미노산 치환들만큼 상이한 폴리펩티드들은 면역학적으로 교차-반응성이다. 따라서, 폴리펩티드는, 예를 들어, 2개의 펩티드가 오직 하나의 보존 아미노산 치환 또는 하나 이상의 보존 아미노산 치환만큼만 상이한 경우, 두 번째 폴리펩티드에 대해 실질적으로 동일하다.

[0093] 관심 핵산이 참고 핵산의 뉴클레오티드 서열에 대해 약 60% 이상, 약 65% 이상, 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 또는 약 99.5% 이상의 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 경우, 관심 핵산은 참고 핵산에 대해 "실질적으로 동일하다"고 말할 수 있다. 2개의 그러한 핵산들 사이의 퍼센트 동일성은 최적으로 정렬된 2개의 핵산 서열의 검사에 의해 수동으로, 또는 표준 파라미터를 사용하는 소프트웨어 프로그램 또는 알고리즘 (예를 들어, BLAST, ALIGN, CLUSTAL)을 사용하여 결정될 수 있다. 2개의 핵산 서열이 실질적으로 동일하다는 하나의 지표는 2개의 핵산 문자들이 엄격한 조건 하에서 (예를 들어, 중간 내지 높은 엄격성(stringency)의 범위 내에서) 서로 혼성화되는 것이다.

[0094] 핵산 또는 폴리뉴클레오티드는, 이것이 예를 들어, 다른 단백질, 핵산, 세포 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다른 구성요소로부터 적어도 부분적으로 또는 완전히 분리될 때, "단리된다". 유사하게, 폴리펩티드, 단백질 또는 펩티드는, 이것이 예를 들어, 다른 단백질, 핵산, 세포 등을 포함하지만 이에 한정되지는 않는 다른 구성요소로부터 적어도 부분적으로 또는 완전히 분리될 때, "단리된다". 몰 기준으로, 단리되는 좋은 조성물 내에서 다른 종보다 훨씬 풍부하다. 예를 들어, 단리되는 좋은 존재하는 모든 거대분자 종들의 적어도 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 100% (몰 기준)를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 관심 좋은 본질적인 균질성

(homogeneity)을 가질 때까지 정제된다(즉, 종래의 검출 방법에 의해서는 조성물에서 오염 종을 검출할 수 없다). 순도 및 균질성은 본 기술 분야에 공지된 다수의 기술들, 예를 들어, 각각, 핵산 또는 단백질 샘플의 아가로스 또는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 사용한 다음, 염색으로 시각화하여 결정될 수 있다. 원한다면, 고-분해능 기술, 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 또는 유사한 수단이 재료의 정제에 사용될 수 있다.

[0095] "혼성화"는 한 가닥의 핵산이 상보적 가닥과 듀플렉스(duplex), 즉, 염기 쌍을 형성하는 프로세스를 지칭한다. 2개의 서열이 중간 내지 높은 염격성의 혼성화 및 세척 조건 하에서 서로 특이적으로 혼성화되는 경우에, 핵산 서열은 참고 핵산 서열에 대해 "선택적으로 혼성화가능한" 것으로 간주된다. 혼성화 조건은 핵산 결합 복합체 또는 탐침의 용융 온도 (T_m)에 기초한다. 예를 들어, "최대 염격성"은 전형적으로 약 $T_m-5^{\circ}\text{C}$ (탐침의 T_m 보다 5 ° 낮은 온도)에서; "높은 염격성"은 T_m 보다 약 5 내지 10°C 낮은 온도에서; "중간 염격성"은 탐침의 T_m 보다 약 10 내지 20°C 낮은 온도에서; 그리고 "낮은 염격성"은 T_m 보다 약 20 내지 25°C 낮은 온도에서 일어난다. 기능상, 최대 염격성의 조건은 혼성화 탐침과의 염격한 동일성 또는 거의 염격한 동일성을 갖는 서열을 동정하는 데 사용될 수 있는 반면; 중간 또는 낮은 염격성의 혼성화는 폴리뉴클레오티드 서열 상동체(homolog)를 동정하거나 검출하는 데 사용될 수 있다.

[0096] 중간 및 높은 염격성의 혼성화 조건이 본 기술 분야에 공지되어 있다. 염격한 혼성화 조건은 하기 조건 하에서의 혼성화에 의해 예시된다: 65°C 및 0.1X SSC (여기서, 1X SSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M Na₃ 시트레이트, pH 7.0). 혼성화된, 듀플렉스 핵산은, 혼성화된 핵산들의 절반이 상보적 가닥과 짹지어지지 않는, 용융 온도 (T_m)에 의해 특징지어진다. 듀플렉스와 미스매치된 핵산은 T_m 을 낮춘다. 매우 염격한 혼성화 조건은 68°C 및 0.1X SSC를 포함한다. 변이체 메탈로프로테아제를 암호화하는 핵산은, 서열 번호 4의 핵산과 그의 동일한 상보체 사이에서 형성된 듀플렉스와 비교하여 1°C 내지 3°C 이상만큼 감소된 T_m 을 가질 수 있다.

[0097] 높은 염격성의 조건의 다른 예는, 50% 포름아미드, 5X SSC, 5X 덴하르트 용액(Denhardt's solution), 0.5% SDS 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 변성 담체 DNA 중에서 약 42°C 에서 혼성화한 후에 실온에서 2X SSC 및 0.5% SDS 중에서 2회 세척하고 42°C 에서 0.1X SSC 및 0.5% SDS 중에서 추가로 2회 세척하는 것을 포함한다. 중간 염격한 조건의 예는 20% 포름아미드, 5 x SSC (150mM NaCl, 15 mM 트라이소듐 시트레이트), 50 mM 인산나트륨 (pH 7.6), 5 x 덴하르트 용액, 10% 텍스트란 설페이트 및 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 변성 시어드 연어 정자(denatured sheared salmon sperm) DNA를 포함하는 용액 중에서 37°C 에서 하룻밤 배양한 후에, 약 37 내지 50°C 에서 1x SSC 중에서 필터를 세척하는 것을 포함한다. 당업자는 온도, 이온 강도 등을 조정하여 탐침 길이 등과 같은 인자를 조절하는 방법을 알고 있다.

[0098] 핵산 또는 폴리펩티드에 적용되는 바와 같이, 용어 "정제된"은 대체로 본 기술 분야에서 공지된 분석 기술들에 의해 결정된 바와 같이 다른 구성요소가 본질적으로 없는 핵산 또는 폴리펩티드를 나타낸다(예를 들어, 정제된 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드는 전기영동 겔, 크로마토그래피의 용출액, 및/또는 밀도 구배 원심분리되는 매질에서 별개의 밴드를 형성한다. 예를 들어, 전기영동 겔에서 본질적으로 하나의 밴드가 생기게 하는 핵산 또는 폴리펩티드는 "정제되어 있다". 정제된 핵산 또는 폴리펩티드는 (예를 들어, 몰 기준으로 한 중량%)로 순도가 적어도 약 50%, 보통 적어도 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 약 99.5%, 약 99.6%, 약 99.7%, 약 99.8% 또는 그 이상이다. 관련된 의미에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 분자들, 예를 들어 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드에 대한 조성물을 농후화하는 방법을 제공한다. 정제 또는 농후화 기술의 적용 후에 분자의 농도가 실질적으로 증가할 때 조성물이 분자에 대해 농후화된다. 실질적으로 순수한 본 발명의 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 각각 본 발명의 실질적으로 순수한 메탈로프로테아제 폴리펩티드 또는 메탈로프로테아제 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드)는 전형적으로, 특정 조성물 내 모든 거대분자 종들의 (몰 기준으로) 적어도 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 약 99.5% 또는 그 이상을 포함할 것이다.

[0099] 용어 "농후화"는 출발 조성물보다 높은 상태 또는 절대 농도로 조성물에 존재하는 화합물, 폴리펩티드, 세포, 핵산, 아미노산, 또는 다른 특정된 물질 또는 성분을 지칭한다.

[0100] 관련된 의미에서, 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 분자, 예를 들어, 본 발명의 하나 이상의 폴리펩티드 (예를 들어, 본 발명의 하나 이상의 메탈로프로테아제 폴리펩티드) 또는 본 발명의 하나 이상의 핵산 (예를 들어, 본 발명의 하나 이상의 메탈로프로테아제 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 핵산)에 대해 조성물을 농후화하는

방법을 제공한다. 정제 또는 농후화 기술의 적용 후에 분자의 농도가 실질적으로 증가할 때 조성물이 분자에 대해 농후화된다. 실질적으로 순수한 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드는 전형적으로, 특정 조성물 내 모든 거대분자 종들의 (물 기준으로) 적어도 약 55 중량%, 약 60 중량%, 약 65 중량%, 약 70 중량%, 약 75 중량%, 약 80 중량%, 약 85 중량%, 약 90 중량%, 약 91 중량%, 약 92 중량%, 약 93 중량%, 약 94 중량%, 약 95 중량%, 약 96 중량%, 약 97 중량%, 약 98 중량%, 약 99 중량%, 약 99.5 중량% 또는 그 이상을 포함할 것이다.

[0101] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "조합 돌연변이 유발(combinatorial mutagenesis)" 또는 "조합"은 참고 핵산 서열의 핵산 변이체의 라이브러리를 생성하는 방법을 지칭한다. 이러한 라이브러리에서, 변이체는 돌연변이의 미리 정의된 세트로부터 선택되는 하나 또는 몇몇 돌연변이를 포함한다. 이러한 방법은 또한 돌연변이의 미리 정의된 세트의 구성원이 아닌 무작위 돌연변이를 도입하는 수단을 제공한다. 일부의 그러한 방법은 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 제6,582,914호에 제시되어 있다. 일부의 그러한 조합 돌연변이 유발 방법은 구매 가능한 키트 (예를 들어, 퀵체인저(QUIKCHANGE)® 멀티 사이트-디렉티드 뮤타제네시스 키트(Multi Site-Directed Mutagenesis Kit) (스트라타진(Stratagene)), PCR 퓨전(fusion)/익스텐션(extension) PCR)에서 구현되는 방법을 포함하고/하거나 포함한다.

[0102] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 변이체 프로테아제와 관련하여 사용되는 "개선된 특성을 갖는"은, 대응하는 참고 프로테아제 (예를 들어, 야생형 또는 자연 발생 프로테아제)에 대해, 개선되거나 향상된 세척 또는 세정 성능을 갖고/갖거나, 선택적으로 세척 또는 세정 성능을 유지하면서 개선되거나 향상된 안정성을 갖는 변이체 프로테아제를 지칭한다. 변이체 프로테아제의 개선된 특성은 개선된 세척 또는 세정 성능 및/또는 개선된 안정성을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 본 방법은 하기 특성들 중 하나 이상을 나타내는 본 발명의 변이체 프로테아제를 제공한다: 참고 프로테아제 (예를 들어, 야생형 프로테아제, 예를 들어, 야생형 써몰리신)에 비해, 개선된 손 세척 성능, 개선된 손 또는 수동 식기세척 성능, 개선된 자동 식기세척 성능, 개선된 세탁 성능, 및/또는 개선된 안정성.

[0103] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "기능적 검정법(functional assay)"은 단백질 활성의 지표를 제공하는 검정법을 지칭한다. 일부 실시 형태에서, 이 용어는 단백질이 그의 보통의 능력에 있어서 기능할 수 있는지에 대해 단백질을 분석하는 검정 시스템을 지칭한다. 예를 들어, 효소의 경우에, 기능적 검정법은 반응을 촉매하는 데 있어서의 효소의 유효성을 결정하는 것을 포함한다.

[0104] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "표적 특성"은, 변경하고자 하는, 출발 유전자의 특성을 지칭한다. 본 발명은 임의의 특정 표적 특성에 한정되는 것으로 의도되지 않는다. 그러나, 일부 실시 형태에서, 표적 특성은 유전자 산물의 안정성 (예를 들어, 변성, 단백질 분해 또는 다른 분해 요인에 대한 저항성)인 한편, 다른 실시 형태에서는, 생산 숙주에서의 생산 수준이 변경된다.

[0105] 핵산의 문맥에서 용어 "특성" 또는 그의 문법적 상당 어구는, 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 선택 또는 검출될 수 있는 핵산의 임의의 특성 또는 속성을 지칭한다. 이들 특성에는, 폴리펩티드에 대한 결합에 영향을 주는 특성, 특정 핵산을 포함하는 세포에 주어지는 특성, 유전자 전사에 영향을 주는 특성 (예를 들어, 프로모터 강도, 프로모터 인식, 프로모터 조절, 인핸서 기능), RNA 프로세싱에 영향을 주는 특성 (예를 들어, RNA 스팡링(splicing), RNA 안정성, RNA 구조, 및 전사 후 변형), 변역에 영향을 주는 특성 (예를 들어, mRNA의 수준, 조절, 리보솜 단백질에 대한 결합, 번역 후 변형)이 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 핵산의, 전사 인자, 폴리머라제, 조절 인자 등에 대한 결합 부위를 변경하여, 원하는 특성을 생성하거나 바람직하지 않은 특성을 확인할 수 있다.

[0106] (단백질을 포함하는) 폴리펩티드의 문맥에서 용어 "특성" 또는 그의 문법적 상당 어구는, 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 선택 또는 검출될 수 있는 폴리펩티드의 임의의 특성 또는 속성을 지칭한다. 이러한 특성에는, 산화 안정성, 기질 특이성, 촉매 활성, 효소 활성, 열 안정성, 알칼리 안정성, pH 활성 프로파일, 단백질 분해에 대한 저항성, K_m , k_{cat} , k_{cat}/k_m 비, 단백질 폴딩, 번역 반응 유발, 리간드에 결합하는 능력, 수용체에 결합하는 능력, 분비 능력, 세포의 표면 상에 디스플레이되는 능력, 올리고머화 능력, 신호 능력, 세포 증식을 모의하는 능력, 세포 증식을 저해하는 능력, 아폽토시스를 유발하는 능력, 포스포릴화 또는 글리코실화에 의해 변형되는 능력, 및/또는 질병 치료 능력 등이 포함되지만 이에 한정되지 않는다.

[0107] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "스크리닝"은 본 기술 분야에서의 그의 보통의 의미를 갖는다. 한 가지 예시적인 스크리닝 프로세스에서는, 돌연변이 핵산 또는 그로부터 암호화된 변이체 폴리펩티드가 제공되며, 돌연변이 핵산 또는 변이체 폴리펩티드의 특성이, 각각, 평가 또는 결정된다. 돌연변이 핵산 또는 변이체 폴리펩티드의 결정된 특성은, 각각, 대응하는 전구 (모) 핵산의 특성 또는 대응하는 모 폴리펩티드의 특성과 비교될

수 있다.

[0108] 변경된 특성을 갖는 핵산 또는 단백질을 얻기 위한 스크리닝 절차는 출발 물질의 특성에 따라 좌우되며 그의 돌연변이는 돌연변이 핵산의 생성을 촉진하도록 의도됨이 숙련자에게 명백할 것이다. 따라서, 숙련자는, 본 발명이 스크리닝할 임의의 구체적인 특성에 한정되지 않으며 특성의 하기 설명은 오직 예시적인 예를 열거하는 것임을 이해할 것이다. 임의의 특정 특성에 대한 스크리닝 방법이 일반적으로 본 기술 분야에 기술되어 있다. 예를 들어, 돌연변이 전 및 후에 결합, pH, 특이성 등을 측정할 수 있는데, 변화는 변경을 나타낸다. 바람직하게는, 스크린은 침, 파지 디스플레이(phage display), 및 다수의 기질 및/또는 인디케이터(indicator)를 이용하는 검정법을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 동시에 스크리닝되는 다수의 샘플을 포함하는 고처리량 방식으로 수행된다.

[0109] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 일부 실시 형태에서, 스크리닝 프로세스는, 변이체의 개체군으로부터 관심 변이체를 농후화하는 하나 이상의 선별 단계를 포함한다. 이러한 실시 형태의 예에는 숙주 유기체에 성장 이점 to 부여하는 변이체의 선별뿐만 아니라 파지 디스플레이 또는 임의의 다른 디스플레이 방법이 포함되는데, 변이체는 그의 결합 또는 촉매 특성에 기초하여 변이체의 개체군으로부터 포함될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 변이체의 라이브러리를 스트레스 (예를 들어, 열, 변성 등)에 노출시키고, 그 후에, 여전히 그대로인 변이체를 스크린에서 동정하거나 또는 선별에 의해 농후화시킨다. 그러한 용어는 선별을 위한 임의의 적합한 수단을 포괄하는 것으로 의도된다. 실제로, 본 발명은 임의의 특정 스크리닝 방법에 한정되는 것으로 의도되지 않는다.

[0110] 용어 "변형된 핵산 서열" 및 "변형된 유전자"는, 자연 발생 (즉, 야생형) 핵산 서열의 결실, 삽입 또는 중단을 포함하는 핵산 서열을 지칭하는 데에 본 명세서에서 호환가능하게 사용된다. 일부 실시 형태에서, (예를 들어, 변형이 서열의 결실 또는 중단(interruption)인 경우) 변형된 핵산 서열의 발현 산물은 절단된(truncated) 단백질이다. 일부 실시 형태에서, 절단된 단백질은 생물학적 활성을 유지한다. 대안적인 실시 형태에서, 변형된 핵산 서열의 발현 산물은 연장된(elongated) 단백질이다(예를 들어, 변형이 핵산 서열로의 삽입을 포함함). 일부 실시 형태에서, 핵산 서열에서의 뉴클레오티드 삽입은 (예를 들어, 삽입이 종결 코돈의 형성을 야기하는 경우) 절단된 단백질을 야기한다. 따라서, 삽입은 발현 산물로서, 절단된 단백질 또는 연장된 단백질 중 어느 하나를 생성할 수 있다.

[0111] "돌연변이" 핵산 서열은 전형적으로, 숙주 세포의 야생형 서열에서 발생하는 적어도 하나의 코돈의 변경을 가진다, 돌연변이 핵산 서열의 발현 산물이 야생형 단백질에 대해 변경된 아미노산 서열을 갖는 단백질인, 핵산 서열을 지칭한다. 발현 산물은 변경된 기능적 능력 (예를 들어, 향상된 효소 활성)을 가질 수 있다.

[0112] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 어구 "기질 특이성의 변경"은 효소의 기질 특이성의 변화를 지칭한다. 일부 실시 형태에서, 기질 특이성의 변화는, 효소의 돌연변이 또는 반응 조건의 변경으로 인한, 특정 기질에 대한 k_{cat} 및/또는 K_m 의 변화로서 정의된다. 효소의 기질 특이성은 상이한 기질에 대해 나타나는 촉매 효율을 비교하여 결정된다. 이러한 결정은, 일반적으로 관심 기재에 대해 더 큰 k_{cat}/K_m 의 비를 나타내는 변이체 효소를 생성하기를 원할 때, 돌연변이 효소의 효율을 평가하는 데 특히 사용된다. 그러나, 본 발명은 임의의 특정 기질 조성물 또는 기질 특이성에 한정되는 것으로 의도되지 않는다.

[0113] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "표면 특성"은 단백질의 표면에 의해 나타나는 소수성 및 친수성과 같은 특성뿐만 아니라 정전하와 관련하여 사용된다.

[0114] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "알짜 전하"는 분자에 존재하는 모든 전하들의 합계로서 정의된다. "알짜 전하 변화"는 모 단백질 분자에 대해 이루어져서 모 분자와는 다른 알짜 전하를 갖는 변이체를 제공한다 (즉, 변이체는 모 분자에서와 동일하지 않은 알짜 전하를 갖는다). 예를 들어, 중성 아미노산을 음으로 하전된 아미노산으로 치환하거나 또는 양으로 하전된 아미노산을 중성 아미노산으로 치환하는 것은 모 분자와 비교하여 -1의 알짜 전하를 야기한다. 양으로 하전된 아미노산을 음으로 하전된 아미노산으로 치환하는 것은 부모와 비교하여 -2의 알짜 전하를 야기한다. 중성 아미노산을 양으로 하전된 아미노산으로 치환하거나 음으로 하전된 아미노산을 중성 아미노산으로 치환하는 것은 부모와 비교하여 +1의 알짜 전하를 야기한다. 음으로 하전된 아미노산을 양으로 하전된 아미노산으로 치환하는 것은 부모와 비교하여 +2의 알짜 전하를 야기한다. 모 단백질의 알짜 전하는 하전된 아미노산의 결실 및/또는 삽입에 의해 또한 변경될 수 있다.

[0115] 용어 "열적으로 안정한" 및 "열 안정한" 및 "열 안정성"은, 변경된 온도에 노출되면서, 본 발명의 단백질 분해, 가수분해, 세정 또는 다른 프로세스 동안 지배적인 조건 하에서, 주어진 기간에 걸쳐, 확인된 온도에 노출 후에, 특정된 양의 효소 활성을 유지하는 프로테아제를 지칭한다. "변경된 온도"는 증가 또는 감소된 온도를

포함한다. 일부 실시 형태에서, 프로테아제는, 주어진 기간, 예를 들어 적어도 약 60분, 약 120분, 약 180분, 약 240분, 약 300분 등에 걸쳐 변경된 온도에 노출된 후에, 적어도 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 92%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 또는 약 99%의 단백질 분해 활성을 유지한다.

[0116] 산화, 퀼레이트제, 열 및/또는 pH 안정한 프로테아제의 문맥에서 용어 "향상된 안정성"은 다른 프로테아제 (예를 들어, 써몰리신 프로테아제) 및/또는 야생형 효소와 비교하여 시간 경과에 따라 더 높게 유지되는 단백질 분해 활성을 지칭한다.

[0117] 산화, 퀼레이트제, 열 및/또는 pH 안정한 프로테아제의 문맥에서 용어 "감소된 안정성"은 다른 프로테아제 (예를 들어, 써몰리신 프로테아제) 및/또는 야생형 효소와 비교하여 시간 경과에 따라 더 낮게 유지되는 단백질 분해 활성을 지칭한다.

[0118] 용어 "세정 활성"은, 본 발명의 단백질 분해, 가수분해, 세정 또는 다른 프로세스 동안 지배적인 조건 하에서 변이체 프로테아제 또는 참고 프로테아제에 의해 성취되는 세정 성능을 지칭한다. 일부 실시 형태에서, 변이체 프로테아제 또는 참고 프로테아제의 세정 성능은, 물품 또는 표면 상의 하나 이상의 다양한 효소 감수성 얼룩 (예를 들어, 식품, 그래스(grass), 혈액, 잉크, 우유, 오일, 및/또는 계란 단백질로부터 기인하는 얼룩)을 세정하는 데 대한 다양한 검정법을 사용하여 결정될 수 있다. 변이체 또는 참고 프로테아제의 세정 성능은, 물품 또는 표면 상의 얼룩을 표준 세척 조건(들)에 처하게 하고, 다양한 크로마토그래피, 분광광도법, 또는 다른 정량적 방법을 사용하여, 얼룩이 제거되는 정도를 평가함으로써 결정될 수 있다. 예시적인 세정 검정법 및 방법이 본 기술 분야에 공지되어 있으며, 하기에 제공된 실시예에 포함된 그러한 세정 검정법 및 방법뿐만 아니라, 본 명세서에 둘 모두가 참고로 포함된, 국제특허 공개 WO 99/34011호 및 미국 특허 제 6,605,458호에 기재된 것을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0119] 변이체 프로테아제 또는 참고 프로테아제의 "세정 유효량"이라는 용어는 특이적 세정 조성물에서 원하는 수준의 효소 활성을 성취하는 프로테아제의 양을 지칭한다. 그러한 유효량은 당업자에 의해 용이하게 확인되며, 사용되는 특정 프로테아제, 세정 응용, 세정 조성물의 특이적 조건, 및 액체 조성물이 필요한지 또는 건조 (예를 들어, 과립, 정제, 바) 조성물이 필요한지의 여부 등과 같은 다수의 요인에 기초한다.

[0120] 용어 "세정 부가 물질"은 본 발명의 변이체 프로테아제 이외에 세정 조성물에 포함되는 액체, 고체, 또는 기체 물질을 지칭한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 하나 이상의 세정 부가 물질을 포함한다. 각각의 세정 부가 물질은 전형적으로 세정 조성물의 특정 유형 및 형태 (예를 들어, 액체, 과립, 분말, 바, 페이스트, 스프레이, 정제, 젤, 폼(foam), 또는 다른 조성물)에 따라 선택된다. 바람직하게는, 각각의 세정 부가 물질은 조성물에 사용되는 프로테아제 효소와 상용성이다.

[0121] 세정 활성의 문맥에서 용어 "향상된 성능"은, 표준 세척 사이를 및/또는 다수의 세척 사이를 후에 보통의 평가에 의해 결정되는 바와 같이, 달걀, 우유, 그래스, 잉크, 오일, 및/또는 혈액과 같은 소정 효소 감수성 얼룩에 대한, 효소에 의한 증가되거나 더 큰 세정 활성을 지칭한다.

[0122] 세정 활성의 문맥에서 용어 "감소된 성능"은, 표준 세척 사이를 후에 보통의 평가에 의해 결정되는 바와 같이, 달걀, 우유, 그래스, 또는 혈액과 같은 소정 효소 감수성 얼룩에 대한, 효소에 의한 감소되거나 더 적은 세정 활성을 지칭한다.

[0123] 세정 성능은, 표준 세척 사이를 조건 후에 보통의 분광광도법 또는 분석 방법에 의해 결정되는 바와 같이, 그래스, 혈액, 잉크, 오일, 및/또는 우유와 같은 효소 감수성 얼룩과 관련된 다양한 세정 검정법에서, 본 발명의 변이체 프로테아제를 참고 프로테아제와 비교함으로써 결정될 수 있다.

[0124] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "소비자 제품"은 패브릭 및 가정용 케어 제품을 의미한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "패브릭 및 가정용 케어 제품" 또는 "패브릭 및 가사 케어 제품"은, 공기 청향제(air freshener) 및 향기 전달 시스템을 포함하는 공기 케어, 자동차 케어, 애완동물 케어, 가축 케어, 개인 케어, 보석류 케어, 식기세척, 패브릭 컨디셔닝 (유연화 및/또는 청향(freshening) 포함), 세탁 세제류, 세탁 및 행굼 첨가제 및/또는 케어, 전처리 세정 조성물, 바닥 및 변기 세정제를 포함하는 경질 표면 세정제 및/또는 트리트먼트, 유리 세정제 및/또는 트리트먼트, 타일 세정제 및/또는 트리트먼트, 세라믹 세정제 및/또는 트리트먼트, 및 소비자 또는 공공시설의 사용을 위한 기타 세정제를 포함하는, 일반적으로, 판매되는 형태로 사용되거나 소비되도록 의도되고, 패브릭, 경질 표면 및 임의의 다른 표면을 처리하기 위한 제품, 및 모두 무생물 표면의 케어 및 세정을 위한 세정 시스템뿐만 아니라, 패브릭 컨디셔너 제품 및 패브릭의 케어 및 유지를 위해 특이적으로 설계된 다른 제품, 및 공기 케어 제품을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 패브릭 및 가정용 케어 제품은 상

처 및/또는 피부에 사용하기에 적합하다. "페브릭 및 가정용 케어 제품"은 소비자 제품 및 공공시설용 제품을 포함한다.

[0125] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "비-페브릭 및 가정용 케어 제품"은, 다른 조성물에 첨가되어, 페브릭 및 가정용 케어 제품일 수 있는 최종 제품을 생산하는 조성물을 지칭한다.

[0126] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "공공시설용 세정 조성물"은 학교, 병원, 공장, 상점, 회사, 건물, 음식점, 사무 단지 및 건물, 가공 및/또는 제조 공장, 동물병원, 공장식 농장, 공장식 목장 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는 공공시설에서 사용하기에 적합한 제품을 지칭한다.

[0127] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "세정 및/또는 처리 조성물"은 달리 표시되지 않는다면, 물품을 세정 및/또는 처리하는 데 적합한 조성물을 포함하는 페브릭 및 가정용 케어 제품의 하위 집합이다. 그러한 제품은, 공기 청향제 및 향기 전달 시스템을 포함하는 공기 케어, 자동차 케어, 식기세척, 페브릭 컨디셔닝 (유연화 및/또는 청향 포함), 세탁 세제류, 세탁 및 행굼 첨가제 및/또는 케어, 바닥 및 변기 세정제를 포함하는 경질 표면 세정제 및/또는 트리트먼트, 과립 또는 분말형 다목적 또는 "강력(heavy-duty)" 세척제, 특히 세정 세제; 액체, 젤 또는 페이스트형 다목적 세척제, 특히 소위 강력 액체형; 액체 미세-페브릭 세제; 손 식기세척제 또는 순한 (light duty) 식기세척제, 특히 고발포형의 것; 가정용 및 공공시설용의 다양한 정제, 과립, 액체, 및 행굼-보조형을 포함하는 기계용 식기세척제: 자동차 또는 카페트 샴푸, 변기 세정제를 포함하는 화장실 세정제뿐만 아니라; 표백 첨가제 및 "얼룩-스틱(stain-stick)" 또는 전처리 유형과 같은 세정 보조제, 건조기 첨가용 시트와 같이 기재에 함유된 제품(substrate-laden product)을 포함하는, 페브릭 및 가정용 케어 분야에서 페브릭, 경질 표면 및 임의의 다른 표면을 처리하기 위한 제품을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0128] 실제로, 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 본 발명의 "세정 조성물" 또는 "세정 제형"은, 예를 들어, 페브릭, 페브릭 물품, 식기류 물품, 식탁용 식기류 물품, 유리제품(glassware) 물품, 콘택트렌즈, 기타 고체 기재, 모발 (샴푸) (인간 또는 동물 모발 포함), 피부 (비누 및/또는 크림), 치아 (구강세척액, 치약), 물품 또는 대상물의 표면 (예를 들어, 경질 표면, 예를 들어, 식탁, 식탁 윗면, 벽, 가구 물품, 바닥, 천정, 비-식기류 물품, 비-식탁용 식기류 물품 등의 경질 표면), 필터, 막 (예를 들어, 한의여과막을 포함하지만 이에 한정되지 않는 여과막) 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 세정할 대상물, 물품, 또는 표면으로부터 화합물 (예를 들어, 원치 않는 화합물)을 제거하거나 없애는 데 유용한 본 발명의 임의의 조성물을 지칭한다. 이 용어는, 조성물이 조성물에 사용되는 프로테아제 및 다른 효소(들)와 상용성이기만 하다면, 원하는 세정 조성물의 특정 유형 및 제품의 형태 (예를 들어, 액체, 젤, 과립, 스프레이, 또는 다른 조성물)를 위해 선택되는 임의의 재료 및/또는 첨가된 화합물을 포함한다. 세정 조성물 재료의 특정 선택은, 세정할 표면, 대상물, 물품, 또는 페브릭, 및 사용 중 세정 조건에 대한 조성물의 원하는 형태를 고려하여 용이하게 이루어진다.

[0129] 세정 조성물 및 세정 제형은 임의의 대상물, 물품, 및/또는 표면을 세정, 표백, 소독, 및/또는 살균하기에 적합한 임의의 조성물을 포함한다. 그러한 조성물 및 제형은, 예를 들어, 세정 또는 세제 조성물을 포함하는 액체 및/또는 고체 조성물(예를 들어, 액체, 정제, 젤, 바(bar), 과립, 및/또는 고체 세탁물 세정 또는 세제 조성물 및 미세 페브릭 세제 조성물; 예를 들어 유리, 목재, 세라믹 및 금속 주방 조리대 및 창을 위한 경질 표면 세정 조성물 및 제형; 카페트 세정제; 오븐 세정제; 페브릭 청향제(fabric freshener); 페브릭 유연제; 및 직물, 세탁 부스터(booster) 세정 또는 세제 조성물, 세탁 첨가제 세정 조성물, 및 세탁 예비 얼룩빼기(pre-spatter) 세정 조성물; 손 또는 수동 식기세척 조성물(예를 들어, "손" 또는 "수동" 식기세척 세제) 및 자동 식기세척 조성물 (예를 들어, "자동 식기세척 세제")을 포함하는 식기세척 조성물)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0130] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 세정 조성물 또는 세정 제형에는, 달리 표시되지 않는다면, 과립 또는 분말형 다목적 또는 강력 세척제, 특히 세정 세제; 액체, 과립, 젤, 고체, 정제, 또는 페이스트형 다목적 세척제, 특히 소위 강력 액체(HDL) 세제 또는 강력 분말 세제(HDD) 유형; 액체 미세-페브릭 세제; 고-발포(hight-foaming) 유형인 것을 포함하는 손 또는 수동 식기세척제; 가정 및 공공시설의 사용을 위한 다양한 정제, 분말, 고체, 과립, 액체, 젤, 및 린스-보조 유형을 포함하는 손 또는 수동 식기세척제, 자동 식기세척제, 또는 식기류 또는 식탁용 식기류 세척제; 항균성 손 세척 유형, 세정 바, 구강세척액, 의치 세정제, 차 샴푸, 카페트 샴푸, 욕실 세정제를 포함하는 액체 세정 및 소독제; 사람 및 다른 동물을 위한 헤어 샴푸 및/또는 헤어-린스; 샤워젤 및 폼 바스 및 금속 세정제; 및 세정 보조제, 예를 들어, 표백 첨가제 및 "얼룩-스틱" 또는 전처리 유형이 포함된다. 일부 실시 형태에서, 과립 조성물은 "콤팩트(compact)" 형태이고; 일부 실시 형태에서, 액체 조성물은 "농축된" 형태이다.

[0131] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "페브릭 세정 조성물"은, 세탁 첨가제 조성물, 및 얼룩진 페브릭 (예를 들어,

의류, 린넨류, 및 기타 직물 재료)의 담금(soaking) 및/또는 전처리에 사용하기에 적합한 조성물을 포함하는 손 세탁 및 기계 세탁 세제 조성물을 포함한다.

[0132] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "비-페브릭 세정 조성물"은, 예를 들어, 손 또는 수동 또는 자동 식기세척 세제 조성물, 구강 세정 조성물, 의치 세정 조성물, 및 개인 세정 조성물을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 비-직물 (즉, 비-페브릭) 표면 세정 조성물을 포함한다.

[0133] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "페브릭 및/또는 경질 표면 세정 및/또는 처리 조성물"은, 달리 표시되지 않는다면, 과립 또는 분말형 다목적 또는 "강력" 세척제, 특히 세정 세제; 액체, 젤, 또는 페이스트형 다목적 세척제, 특히 소위 강력 액체 유형; 액체 미세-페브릭 세제; 손 식기세척제 또는 순한 식기세척제, 특히 고발포 유형의 것; 가정용 및 공공시설용의 다양한 정제, 과립, 액체, 및 헹굼-보조형을 포함하는 기계용 식기세척제; 액체 세정 및 소독제, 자동차 또는 카페트 샴푸, 변기 세정제를 포함하는 화장실 세정제; 액체, 고체 및/또는 건조기 시트(dryer sheet) 형태의 유연화 및/또는 청향을 포함하는 페브릭 컨디셔닝 제품; 및 표백 첨가제 및 "얼룩-스틱" 또는 전처리 유형과 같은 세정 보조제, 건조기 첨가용 시트와 같이 기재에 함유된 제품을 포함하는, 세정 및 처리 조성물의 하위집합이다. 적용 가능한 그러한 제품 모두는 표준 형태, 농축된 형태, 또는 심지어 그러한 제품이 소정 태양에서 비-수성일 수 있는 정도까지 더욱 고도로 농축된 형태일 수 있다.

[0134] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "세제 조성물" 또는 "세제 제형"은 특정 페브릭 및/또는 비-페브릭 대상물 또는 물품을 포함하는 오염된 또는 더러운 대상물의 세정을 위한 세척 매질에 사용하기 위해 의도된 조성물과 관련하여 사용된다. 본 발명의 그러한 조성물은 임의의 특정 세제 조성물 또는 제형에 한정되지 않는다. 실제로, 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세제는 본 발명의 적어도 하나의 변이체 프로테아제를 포함하고, 추가로, 하나 이상의 계면활성제, 트랜스파라제(들), 가수분해 효소, 산화 환원 효소, 중강제(builder)(예를 들어, 중강제 염), 표백제, 표백 활성제, 청분제(bluing agent), 형광 염료, 케이킹(caking) 억제제, 마스킹제(masking agent), 효소 활성제, 항산화제, 및/또는 가용화제를 포함한다. 몇몇 경우에, 중강제 염은 실리케이트 염과 포스페이트 염의 혼합물이며, 바람직하게는 포스페이트 (예를 들어, 소듐 트라이폴리포스페이트)보다 실리케이트(예를 들어, 소듐 메타실리케이트)가 더 많은 혼합물이다. 세정 조성물 또는 세제 조성물과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 본 발명의 일부 조성물은 어떠한 포스페이트 (예를 들어, 포스페이트 또는 포스페이트 중강제)도 함유하지 않는다.

[0135] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "표백"은 재료 (예를 들어, 페브릭, 세탁물, 펄프 등) 또는 표면을 충분한 길이의 시간 동안 및/또는 적절한 pH 및/또는 온도 조건 하에서 처리하여 재료의 중백 (즉, 미백) 및/또는 세정을 달성하는 것을 지칭한다. 표백에 적합한 화학물질의 예에는, 예를 들어, ClO_2 , H_2O_2 , 과산, NO_2 등이 포함되지만 이에 한정되지 않는다.

[0136] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 프로테아제 (예를 들어, 본 발명의 변이체 프로테아제)의 "세척 성능"은, 조성물에 변이체 프로테아제를 첨가하지 않은 세제와 비교하여 세제에 대한 추가적인 세정 성능을 제공하는, 세척에 대한 변이체 프로테아제의 기여를 지칭한다. 세척 성능은 관련 세척 조건 하에서 비교된다. 일부 테스트 시스템에서, 다른 관련 인자, 예를 들어 세제 조성물, 거품 농도(sud concentration), 물 경도, 세척 기기, 시간, pH, 및/또는 온도는 소정의 시장 세그먼트(예를 들어, 손 또는 수동 식기세척, 자동 식기세척, 식기류 세정, 식탁용 식기류 세정, 페브릭 세정 등)에서 가정 응용에 전형적인 조건을 모방하는 방식으로 제어될 수 있다.

[0137] 용어 "관련 세척 조건"은, 본 명세서에서, 손 식기세척, 자동 식기세척, 또는 세탁 세제 시장 세그먼트에 있어서 가정에서 실제로 사용되는 조건, 특히 세척 온도, 시간, 세척 기기, 거품 농도, 세제 유형 및 물 경도를 나타내는 데 사용된다.

[0138] 용어 "개선된 세척 성능"은, 관련 세탁 조건 하에서의 얼룩 제거에 있어서 우수한 최종 결과가 얻어짐을 나타내거나, 또는 대응하는 야생형 또는 출발 모 프로테아제와 비교하여 동일한 최종 결과를 얻는 데 필요한 변이체 프로테아제가, 중량 기준으로, 더 적음을 나타내는 데 사용된다.

[0139] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "소독"은 표면으로부터 오염물을 제거하는 것뿐만 아니라, 물품의 표면상의 미생물을 저해 또는 사멸하는 것을 지칭한다. 본 발명을 임의의 특정 표면, 물품, 또는 제거될 오염물(들) 또는 미생물들에 한정되는 것으로 의도되지 않는다.

[0140] 본 명세서에서 세정 조성물의 "콤팩트" 형태는 밀도에 의해, 그리고 조성의 관점에서, 무기 충전제 염의 양에 의해 가장 잘 반영된다. 무기 충전제 염은 분말 형태의 세제 조성물의 통상적인 성분이다. 통상적인 세제 조

성물에서, 충전제 염은 상당한 양으로, 전형적으로 전체 조성물의 약 17 내지 약 35 중량%로 존재한다. 대조적으로, 콤팩트 조성물에서는, 충전제 염은 총 조성물의 약 15%를 초과하지 않는 양으로 존재한다. 일부 실시 형태에서, 충전제 염은 조성물의 약 10 중량%, 또는 더욱 바람직하게는, 약 5 중량%를 초과하지 않는 양으로 존재한다. 일부 실시 형태에서, 무기 충전제 염은 설페이트 및 클로라이드의 알칼리 및 알칼리 토금속 염으로부터 선택된다. 일부 실시 형태에서, 충전제 염은 황산나트륨이다.

[0141] 주어진 아미노산 서열에서 아미노산 잔기의 위치는 전형적으로 서열 번호 3에 나타난 *G. 칼도프로테올리티쿠스* (*G. caldoproteolyticus*) 씨몰리신 아미노산 서열의 대응하는 아미노산 잔기의 위치의 번호 매기기를 사용하여 본 명세서에서 번호가 매겨진다. 따라서, 서열 번호 3에 나타난 *G. 칼도프로테올리티쿠스* 씨몰리신 아미노산 서열이 참고 서열의 역할을 한다. 주어진 아미노산 서열, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 변이체 프로테아제 아미노산 서열은, 본 명세서에 기재된 바와 같은 정렬 알고리즘을 사용하여 *G. 칼도프로테올리티쿠스* 서열 (서열 번호 3)과 정렬될 수 있고, *G. 칼도프로테올리티쿠스* 서열에서의 아미노산 잔기와 정렬된 (바람직하게는 최적으로 정렬된) 주어진 아미노산 서열에서의 아미노산 잔기는 씨몰리신 *G. 칼도프로테올리티쿠스* 서열에서의 대응하는 아미노산 잔기를 참고하여 편리하게 번호가 매겨질 수 있다.

[0142] 일반적으로, 본 명세서에 사용되는 명명법, 및 하기에 기재된 세포 배양, 분자 유전학, 분자 생물학, 핵산화학, 및 단백질 화학에서의 다수의 실험실 절차는 당업자에게 공지되어 있으며 일반적으로 이용된다. 재조합 핵산의 생산 및 조작 방법, 핵산 합성, 세포 배양 방법, 및 이식유전자 혼입(transgene incorporation) (예를 들어, 형질주입, 전기천공)은 당업자에게 공지되어 있으며 다수의 표준 교과서에 기재되어 있다. 올리고뉴클레오티드 합성 및 정제 단계는 전형적으로 명세서에 따라 수행된다. 기술 및 절차는 일반적으로 본 기술 분야에서 공지된 종래의 방법 및 본 문서 전반에서 제공된 다양한 일반적인 참고 문헌에 따라 수행된다. 그러한 절차들은 당업자에게 공지되어 있는 것으로 여겨지며 독자의 편의를 위해 제공된다.

본 발명의 씨몰리신 효소

[0144] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 씨몰리신 효소는 단백질 분해 활성을 나타내는, 효소, 폴리펩티드, 또는 단백질, 또는 이의 활성 단편을 포함한다. 이것은, 씨몰리신 (TLN; EC 3.4.24.27)이 프로토타입인 웨티다제 패밀리 M4의 구성원들을 포함한다.

씨몰리신 효소의 생산 위치

[0146] 본 발명은, 적합한 변형이 세척 성능, 세제 조성물에서의 효소의 안정성 및 효소의 열 안정성에 대한 최소 성능 지수를 가져오는 한편, 모 씨몰리신 효소로부터 개선된 이러한 특성을 중 적어도 하나를 갖는, 세제 조성물에 유용할 수 있는 씨몰리신 효소에서의 아미노산 위치를 제공한다. 이러한 변형은 본 발명의 변형에 적합한 것으로 간주된다.

[0147] 본 발명의 씨몰리신 효소의 안정성은, 예를 들어, 표준, 서열 번호 3의 *G. 칼도프로테올리티쿠스* 씨몰리신의 안정성과 비교될 수 있다.

[0148] 용어 "열적 안정성" 및 "열 안정성"은, 예를 들어, 변경된 온도에 노출되면서, 단백질 분해, 가수분해, 세정 또는 본 명세서에 개시된 다른 프로세스 동안 지배적인 조건 하에서 종종 주어진 기간에 걸쳐, 확인된 온도에 노출 후에, 특정된 양의 효소 활성을 유지하는 본 발명의 씨몰리신을 지칭한다. 변경된 온도는 증가 또는 감소된 온도를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변이체 씨몰리신 변이체는, 주어진 기간, 예를 들어 적어도 약 60분, 약 120분, 약 180분, 약 240분, 약 300분 등에 걸쳐, 변경된 온도에 노출 후에, 적어도 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 92%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 또는 약 99%의 씨몰리신 활성을 유지한다.

[0149] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 개선된 특성의 변이체 씨몰리신 효소에는, 대응하는 모 씨몰리신 효소 (예를 들어, 야생형 또는 자연 발생 씨몰리신 효소)에 비해, 개선되거나 향상된 세척 또는 세정 성능을 갖고/갖거나, 선택적으로 세척 또는 세정 성능을 유지하면서, 개선되거나 향상된 안정성을 갖는 변이체 씨몰리신 효소가 포함된다. 변이체 씨몰리신 효소의 개선된 특성은 개선된 세척 또는 세정 성능 및/또는 개선된 안정성을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 본 발명은 하기 특성을 중 하나 이상을 나타내는 본 발명의 변이체 씨몰리신 효소를 제공한다: 참고 모 씨몰리신 효소 (예를 들어, 야생형 씨몰리신 효소, 예를 들어, 서열 번호 3의 서열을 갖는 야생형 씨몰리신)에 비해, 개선된 손 세척 성능, 개선된 손 또는 수동 식기세척 성능, 개선된 자동 식기세척 성능, 개선된 세탁 성능, 및/또는 개선된 안정성.

[0150] 생산 위치는, 개선된 특성을 나타내는 조합 변이체를 제조하는 데 가장 유용한, 분자 내의 그러한 위치로서 설

명되는데, 그러한 위치 그 자체가 적어도 하나의 조합가능 돌연변이를 가능하게 한다. 조합가능 돌연변이는 조합 변이체를 제조하는 데 사용될 수 있는 분자 내의 그러한 치환으로서 설명될 수 있다. 조합가능 돌연변이는, 발현, 활성, 또는 안정성 중 어느 것도 유의하게 감소시키지는 않으면서, 분자의 적어도 하나의 원하는 특성을 개선하는 것이다.

[0151] 조합가능 돌연변이는, 발현, 활성, 또는 안정성 중 어느 것도 유의하게 감소시키지는 않으면서, 분자의 적어도 하나의 원하는 특성을 개선하는 것이다. 예를 들어, 써몰리신에서의 조합가능 돌연변이는 실시예 1에 기재된 검정법: Abz-AGLA-Nba 프로테아제 검정법 (활성), PAS-38 마이크로스와치 검정법 (활성), 세제 안정성 및 열 안정성 검정법, 및 단백질 결정(발현)으로부터 얻은 성능 지수 (PI) 값을 사용하여 결정될 수 있다.

[0152] 조합가능 돌연변이에 더하여, 써몰리신에 대한 돌연변이의 제2 그룹은 활성 조합가능 돌연변이이다. 활성 조합 가능 돌연변이는, 발현 또는 안정성 PI 값 중 어느 것도 0.5 미만으로 감소시키지 않으면서, 1.5 이상의 성능 지수로, 분자의 적어도 하나의 활성 특성을 개선하는 것이다. 이러한 활성 조합가능 돌연변이는, 분자의 다른 공지된 원하는 특성 (예를 들어 발현 또는 안정성)을 유의하게 감소시키지는 않으면서 원하는 특성을 성취하도록 분자를 변형하는 데 사용될 수 있다.

[0153] 유용한 위치인 것으로 밝혀진 써몰리신 효소 아미노산 위치는 세제 조성물에서 사용하기에 적합한 상이한 변형들을 가질 수 있다. 변형은 특정 위치에서의 삽입, 결실 또는 치환을 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서, 변형은 치환이다. 각각의 위치에 대해서, 더 많은 수의 가능하고 적합한 변형은 그러한 위치에 대한 더 높은 생산성 스코어(productivity score)를 야기한다. 예를 들어, 아미노산 위치는 생산 위치에서 적합한 변형으로서 테스트된 변형들 중 적어도 75%, 40% 또는 15%를 가질 수 있고, 여기서 변형은 하기 적합성 기준들 중 적어도 하나를 만족한다:

a) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 위치;

b) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 위치; 또는

c) pH 6 또는 pH 8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 위치.

[0157] 적합한 변형으로서 테스트된 변형들 중 75% 이상을 갖는 본 발명의 써몰리신 효소 위치는 위치 2, 26, 47, 49, 53, 65, 87, 91, 96, 108, 118, 128, 154, 179, 196, 197, 198, 199, 209, 211, 217, 219, 225, 232, 256, 257, 259, 261, 265, 267, 272, 276, 277, 286, 289, 290, 293, 295, 298, 299, 300, 301, 303, 305, 308, 311, 및 316을 포함하며, 여기서, 써몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 써몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다. 적합한 변형은 2 (T,F,L,P,S,V,W,Y,Q,A,C,I,K,M), 26 (T,K,L,R,V,Y,W,F,G,H,I,M,C,D), 47 (R,A,C,H,K,N,D,E,G,L,M,Q,T), 49 (T,A,D,F,H,I,S,W,L,N,Q,V,E,M,Y), 53 (S,F,H,I,M,Q,T,W,K,R,A,N,V,C,L), 65 (S,I,M,Q,V,L,T,W,A,D,E,P,Y), 87 (V,D,E,G,I,S,P,R,T,C,K,L,M,N,Q,W,Y), 91 (L,D,E,F,K,M,P,Q,S,A,N,R,W,Y), 96 (N,C,D,I,V,F,T,G,H,Q,R,S,W,K,L,Y), 108 (Q,C,E,F,H,A,D,I,K,N,L,M), 118 (S,C,G,E,A,D,M,Q,R,T,V), 128 (Q,C,D,E,R,S,V,I,K,A,L,Y), 154 (G,L,Q,S,T,D,I,W,C,N,A,H,K,M,Y), 179 (Y,A,D,H,M,N,Q,S,T,W,F), 196 (G,D,E,T,K,R,V,H,L,Y,A,W), 197 (I,D,K,L,T,V,W,Y,A,H,N,E,Q,R,F,C), 198 (S,C,E,F,G,H,I,P,Q,T,V,M,N,R,W,A,K), 199 (G,C,E,F,H,Q,S,T,W,L,A,Y), 209 (A,D,E,L,S,T,V,G,I,K,P,R,Y,C,M), 211 (Y,A,C,D,F,G,H,I,L,N,Q,S,T,E,R), 217 (Y,Q,S,T,V,W,G,A,F,M,N,C,L), 219 (K,D,F,G,H,I,M,N,Q,T,A,E,R,S), 225 (Q,D,G,H,I,P,V,W,A,M,R,C,E,K,L,S), 232 (I,C,E,F,K,M,N,Q,W,G,L,R,S,T,V,Y), 256 (V,L,T,K,A,D,F,G,H,R,S,N), 257 (G,C,D,E,L,N,P,Q,S,T,Y,K,R), 259 (G,A,C,E,F,H,L,M,W,K,R,N,S,T), 261 (D,A,N,P,V,W,G,H,I,S), 265 (K,A,C,D,M,P,Q,S,G,I,L,R,N), 267 (F,E,G,N,S,V,W,A,C,H,I,K,L,M,T,Y), 272 (T,E,L,V,W,P,Y,C,F,N,Q,A,K), 276 (T,C,F,I,P,Q,W,H,A,L,V,Y), 277 (P,Q,S,T,E,F,G,H,N,R,V,W,A,D,Y), 286 (A,D,E,F,G,H,I,S,P,C,Q,R,T,K,L,M,N,Y), 289 (V,C,E,F,G,I,N,S,W,R,T,L,M,Y,A), 290 (Q,C,D,F,G,L,W,Y,R,T,V,A,H,N), 293 (T,C,E,F,G,H,Q,S,N,V,W,A,I,K,L,M,Y), 295 (L,C,I,N,T,V,F,G,A,K,M,W), 298 (S,C,T,W,Y,E,N,P,A,G,K,M,R),

299 (T,C,F,L,M,R,W,P,D,Q,N,A,K), 300 (S,C,K,M,R,Y,I,L,H,P,V,W,A,G,T,D,N), 301 (Q,E,H,P,R,L,C,F,G,W,M,S,T,V,K), 303 (V,C,H,G,K,L,R,W,A,P,Y), 305 (S,G,I,L,N,W,Y,Q,H,T,V,A,K,M), 308 (Q,C,D,F,G,I,M,R,V,W,Y,A,L), 311 (D,C,E,F,G,I,Q,S,T,A,K,L,M,V,W,Y), 및 316 (K,D,E,F,G,H,L,N,P,Q,R,S,V,W,Y,A,M)을 포함하며, 여기서, 썬몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0158] 적합한 변형으로서 테스트된 변형들 중 40% 이상이지만 75% 미만을 갖는 본 발명의 썬몰리신 효소 위치 1, 4, 17, 25, 40, 45, 56, 58, 61, 74, 86, 97, 101, 109, 149, 150, 158, 159, 172, 181, 214, 216, 218, 221, 222, 224, 250, 253, 254, 258, 263, 264, 266, 268, 271, 273, 275, 278, 279, 280, 282, 283, 287, 288, 291, 297, 302, 304, 307, 및 312를 포함하며, 여기서, 썬몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다. 적합한 변형은 1 (I,K,M,V,A,H,W,Y,C,L), 4 (T,E,A,N,R,V,K,L,M,Y), 17 (Q,I,W,Y,C,R,V,T,L), 25 (S,D,F,A,C,K,M,R), 40 (F,E,G,M,Q,S,Y,W,A,K,L), 45 (K,E,L,S,F,H,Q,Y,A,G,M), 56 (A,K,Q,V,W,H,I,Y,E,M), 58 (A,N,Y,C,V,E,L), 61 (Q,M,R,W,F,V,C,I,L), 74 (H,E,L,V,C,F,M,N,Q,W), 86 (N,L,S,Y,A,C,E,F,G,K,D), 97 (N,K,C,R,S,Y,E,M), 101 (R,T,C,L,S,H), 109 (G,A,L,S,E,M,R,W), 149 (T,M,V,A,L,D,S,N), 150 (D,A,F,K,N,Q,T,V,S), 158 (Q,A,K,M,N,L,R,Y,S), 159 (N,R,W,A,C,G,M,T,S,Y), 172 (F,G,L,M,Q,S,V,W,Y,D,H), 181 (N,L,A,G,K,M,T,S), 214 (P,C,G,K,S,N,A,R), 216 (H,C,E,S,T,R,A), 218 (S,K,L,Y,F,G,T,V), 221 (Y,K,N,Q,R,S,T,V,A,F,G,M), 222 (T,C,D,L,Y,I,V,A,M,K), 224 (T,K,M,F,L,P,Q,V,Y,E,H), 250 (H,A,C,K,M,N,P,Q,R,V,Y), 253 (V,N,T,I,R,Y,M,Q), 254 (S,A,M,R,Y,K,L,N,V,W), 258 (I,E,L,M,N,R,S,A,C,K,Q,V), 263 (L,C,I,Q,T,H,K,N,V,A,M), 264 (G,C,R,A,N,P,Q,S,T), 266 (I,A,F,L,S,C,M,T,V), 268 (Y,M,Q,V,A,S,K), 271 (L,A,D,F,I,N,Y,H), 273 (Q,A,H,Y,C,S,W,E,G,N), 275 (L,I,M,V,C,Q,S,T), 278 (T,G,K,R,Y,C,H,M,N,Q,S), 279 (S,A,D,I,L,M,N,Q,T,G), 280 (N,A,C,D,E,G,Q,H,T), 282 (S,K,N,R,A,H,L,M,T), 283 (Q,K,L,P,R,W,Y,S), 287 (A,I,L,N,V,Y,K,R,T,D,C), 288 (A,C,I,S,T,V,Y,N,L,M), 291 (S,E,I,L,M,N,V,A,T), 297 (G,A,M,R,Y,C,F,K,T,D,N), 302 (E,K,L,G,T,V,D,Q,A), 304 (A,C,D,L,N,R,S,T,W,E,K,Y), 307 (K,A,C,G,I,M,N,Q,R,W,Y,H), 및 312 (A,G,M,V,L,N,R,T,C)를 포함하며, 여기서, 썬몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0159] 적합한 변형으로서 테스트된 변형들 중 15% 이상이지만 40% 미만을 갖는 본 발명의 썬몰리신 효소 위치 5, 9, 11, 19, 27, 31, 33, 37, 46, 64, 73, 76, 79, 80, 85, 89, 95, 98, 99, 107, 127, 129, 131, 137, 141, 145, 148, 151, 152, 155, 156, 160, 161, 164, 168, 171, 176, 180, 182, 187, 188, 205, 206, 207, 210, 212, 213, 220, 227, 234, 235, 236, 237, 242, 244, 246, 248, 249, 252, 255, 270, 274, 284, 294, 296, 306, 309, 310, 313, 314, 및 315를 포함하며, 여기서, 썬몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다. 적합한 변형은 5 (S,D,N,P,H,L), 9 (V,L,T,I), 11 (R,I,Y,K), 19 (N,L,Y,K,S), 27 (Y,W,A,M,V,C,L), 31 (Q,A,K,V,I,C,Y), 33 (N,S,T,K,A,C,L,M), 37 (N,D,Q,R,L,K), 46 (Y,L,H,N,C), 64 (A,H,Q,T,D,E), 73 (A,I,F,L,M,W), 76 (Y,H,L,M,Q,T), 79 (V,L,Q,T,A,N,S), 80 (T,I,D,A,L,N), 85 (K,E,A,L,N,R,S), 89 (N,L,M,H), 95 (G,A,D,H,M,N,S), 98 (A,C,E,H,R,Y,K,V), 99 (A,E,K,P,R,S), 107 (S,D,K,Y,A,G), 127 (G,C,D,E), 129 (T,I,R,E,Y,L,M), 131 (I,Y,W,L), 137 (I,P,A,E,T,V,L), 141 (A,S,C,G), 145 (T,A,C,E,G,M,N,Q), 148 (V,L,N,Y,M,A,Q), 151 (Y,K,G,H,S,W), 152 (T,S,L,M,G), 155 (L,C,I,M), 156 (I,M,T,L,Q), 160 (E,L,Y,Q), 161 (S,A,N,P,T), 164 (I,L,N,S,T,V,C,A), 168 (I,A,M,T,L), 171 (I,C,E,F,L,S,G), 176 (V,L,N,C), 180 (A,E,G,K,T,S), 182 (K,L,A,W), 187 (E,L,D), 188 (I,L,V), 205 (M,L,A,V,Q), 206 (S,A,C,K,L,M,R), 207 (D,A,H,N), 210 (K,I,L,V), 212 (G,Y,A,D,Q), 213 (D,N,S,L,A,G,W), 220 (R,K,V,A), 227 (N,D,L,Y,A), 234 (S,D,N,A,C), 235 (G,M,C,Q,S,A), 236 (I,M,A,C), 237 (I,N,F,M), 242 (Y,C,F,N,V), 244 (I,T,V,F,A,M,L), 246 (Q,E,N,T,L,C,D), 248 (G,A,E,S), 249 (T,K,M,N,L,Y,P), 252 (G,K,Y,A,S,T,W), 255 (V,L,P,A,Y,M,N), 270 (A,C,F,I,L,S,G), 274 (Y,F,H,A,C,Q,T,M), 284 (L,V,W,A,M,Y), 294 (D,A,V,Q,N), 296 (Y,N,L,R,H,W,M), 306 (V,A,S,F,I,L,T), 309 (A,G,S,T,V,C), 310 (F,A,C,W,M), 313 (V,T,A,G,L,I,C), 314 (G,A,E,H,M,S,W,Q), 및 315 (V,A,C,I,M,L,T)를 포함하며, 여기서, 썬몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0160] 적합한 변형으로서 테스트된 변형들 중 적어도 하나의 변형이지만 15% 미만을 갖는 본 발명의 썬몰리신 효소 위치는 위치 3, 6, 7, 20, 23, 24, 44, 48, 50, 57, 63, 72, 75, 81, 92, 93, 94, 100, 102, 103, 104, 110, 117, 120, 134, 135, 136, 140, 144, 153, 173, 174, 175, 178, 183, 185, 189, 193, 201, 223, 230, 238, 239, 241, 247, 251, 260, 262, 269, 및 285를 포함하며, 여기서, 썬몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번

호 3에 제시된 씨몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다. 적합한 변형은 3 (G,Y), 6 (T,C,V), 7 (V,L,I), 20 (I,L,V), 23 (T,F,W), 24 (Y,W), 44 (A,C), 48 (T,E,D), 50 (L,P), 57 (D,K), 63 (F,Y,C), 72 (D,F,W), 75 (Y,A), 81 (Y,F), 92 (S,L), 93 (Y,T,C), 94 (D,T), 100 (I,L,V), 102 (S,G,N), 103 (S,T), 104 (V,A), 110 (Y,L), 117 (G,H), 120 (M,L), 134 (S,A,P), 135 (G,A), 136 (G,A,S), 140 (V,D), 144 (L,T), 153 (A,T), 173 (G,A,C), 174 (T,C,A), 175 (L,H,S), 178 (F,H,Y), 183 (N,S), 185 (D,E), 189 (G,A), 193 (Y,F), 201 (S,C,A), 223 (G,D,K), 230 (V,A), 238 (N,L,M), 239 (K,A), 241 (A,L,S), 247 (G,A,S), 251 (Y,M), 260 (R,A,N), 262 (K,A), 269 (R,V,K), 및 285 (R,K,Y)를 포함하며, 여기서, 씨몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 씨몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0161] 이러한 아미노산 위치는 모 씨몰리신 효소에 대한 조합 변형을 위해 유용한 위치로 간주될 수 있다. 따라서, 본 발명은 상기 위치들 중 임의의 위치에 하나 이상의 변형을 갖는 씨몰리신 효소를 포함한다. 적합한 변형은 1(I,V), 2(T,C,I,M,P,Q,V), 127(G,C), 128(Q,C,E,F,I,L,V,Y), 180(A,E,N), 181(N,A,G,Q,S), 196(G,L,Y), 197(I,F), 198(S,A,C,D,E,H,I,M,P,Q,T,V,Y), 211(Y,A,C,E,F,H,I,Q,S,T,V,W), 224(T,D,H,Y), 298(S,A,C,E,F,G,K,M,N,P,Q,R,T,W,Y), 299(T,A,C,D,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,W), 및 316(K,A,D,E,H,M,N,P,Q,S,T,V,Y)을 포함하며, 여기서, 씨몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 씨몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

씨몰리신 효소의 적합한 변형

[0163] 본 발명은 모 씨몰리신 효소로부터의 하나 이상의 변형을 갖는 씨몰리신 효소의 효소 변이체를 포함한다. 효소 변이체는, 세척 성능, 세제 조성물에서의 효소 안정성 및 효소의 열 안정성에 대한 최소 성능 지수를 갖는 한편, 이러한 특성들 중 적어도 하나가 모 씨몰리신 효소에 비해 개선됨으로써, 세제 조성물에 유용할 수 있다.

[0164] 모 씨몰리신 효소와 비교하여 개선된 세제 안정성 또는 열 안정성을 갖고, 변형은 서열 번호 3에 제시된 씨몰리신의 아미노산 서열의 모든 잔기에 대한 평균 주체 온도 인자를 초과하여 관측 분산의 1.5배보다 큰 온도 인자를 갖는 위치에 있는, 본 발명의 씨몰리신 효소 위치는 위치 1, 2, 127, 128, 180, 181, 195, 196, 197, 198, 199, 211, 223, 224, 298, 299, 300, 및 316을 포함하며, 여기서, 씨몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 씨몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0165] 씨몰리신의 안정성 변이체는, 거대분자의 개별 원자들의 상대적인 움직임의 척도인 결정학적 온도 인자 (crystallographic temperature factor)에 기초하여, 증가된 온도 인자를 갖는 위치에서 변형을 포함할 수 있다. 온도 인자는, 결정 x-선 회절 최대치의 개별 강도로서 주어지는 계산된 회절 패턴이 관측 패턴과 가장 잘 정합하도록, 결정학적 모델을 정교화한 결과로서 나타난다. 온도 인자는, 식 $-\exp(-B\sin^2\Theta/\lambda)$ (여기서, B는 온도 인자임)를 사용하여, 더 큰 움직임을 갖는 원자들이 산란각 (세타)의 함수로서 전체 거대분자 응집체 회절의 감소 효과를 가질 것임을 반영하도록 감쇠 인자 (attenuation factor)로서 정교화될 수 있다 (문헌 [Blundell, T. L. and Johnson L. N., Protein Crystallography, Academic Press, 1976, pp121]). 더 높은 전반적 이동성을 갖는 영역은 또한 풀딩된 거대분자가 덜 안정한 지점을 나타낼 수 있고 따라서 온도 또는 변성의 증가에 의해 분자가 스트레스를 받을 때 풀링(unfolding)이 시작되는 지점일 수 있는 가능성성이 크다. 전반적 이동성이 더 높은 이러한 영역은 평균 온도 인자가 가장 높은 영역일 것으로 또한 예상된다.

[0166] 씨몰리신에 대해 컨센서스 유연성 (consensus flexibility) 영역으로서 계산되는 영역은 영역 1-2, 127-128, 180-181, 195-199, 211, 223-224, 298-300 및 316을 포함한다. 각각의 이러한 영역은, 열 안정성 또는 개선된 세탁 성능 중 어느 하나를 달성하도록 씨몰리신을 변형하는 데 사용될 수 있다. 높은 온도 인자를 갖는 위치 (고 유연성 영역)의 변형에 의해 열 안정성 또는 개선된 세탁 성능 중 어느 하나를 부여하는 조합가능한 변이체는 위치 1, 2, 127, 128, 180, 181, 196, 197, 198, 211, 224, 298, 299, 및 316을 포함한다. 적합한 변형은 1 (I,V), 2 (T,C,I,M,P,Q,V), 127 (G,C), 128 (Q,C,E,F,I,L,V,Y), 180 (A,E,N), 181 (N,A,G,Q,S), 196 (G,L,Y), 197 (I,F), 198 (S,A,C,D,E,H,I,M,P,Q,T,V,Y), 211 (Y,A,C,E,F,H,I,Q,S,T,V,W), 224 (T,D,H,Y), 298 (S,A,C,E,F,G,K,M,N,P,Q,R,T,W,Y), 299 (T,A,C,D,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,W), 316 (K,A,D,E,H,M,N,P,Q,S,T,V,Y)을 포함하며, 여기서, 씨몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 씨몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

활성 조합가능 돌연변이

[0168] 조합가능 돌연변이에 더하여, 씨몰리신에 대한 돌연변이의 제2 그룹은 활성 조합가능 돌연변이이다. 활성 조합 가능 돌연변이는, 세제 안정성 또는 열 안정성 PI 값 중 어느 것도 0.5 미만으로 감소시키지 않으면서, pH6 또

는 pH8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성이 1.5 이상인 돌연변이이다. 활성 조합 가능 돌연변이 위치는 17, 19, 24, 25, 31, 33, 40, 48, 73, 79, 80, 81, 85, 86, 89, 94, 109, 117, 140, 141, 150, 151, 152, 153, 156, 158, 159, 160, 161, 168, 171, 174, 175, 176, 178, 180, 181, 182, 183, 189, 205, 206, 207, 210, 212, 213, 214, 218, 223, 224, 227, 235, 236, 237, 238, 239, 241, 244, 246, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 258, 259, 260, 261, 262, 266, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 276, 278, 279, 280, 282, 283, 294, 295, 296, 297, 300, 302, 306, 310, 및 312로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치를 포함하며, 여기서, 썬몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다. 활성 조합 가능 돌연변이는 17 (E,F,P), 19 (A,D,H,I,R,T,V), 24 (F,H), 25 (H), 31 (L), 33 (Q), 40 (C), 48 (A,R), 73 (Y), 79 (C), 80 (C,R), 81 (H), 85 (C,M,Y), 86 (V), 89 (K,R,T,V), 94 (E), 109 (D), 117 (A,K,R,T), 140 (S), 141 (T), 150 (E,M,W), 151 (A,C,E,I), 152 (D), 153 (V), 156 (H,R), 158 (F,G,I,V), 159 (F,I,K), 160 (S), 161 (Y), 168 (N), 171 (D), 174 (S,V), 175 (C,E,F,G,I), 176 (E,Q), 178 (C,M), 180 (L,W), 181 (Y), 182 (F,R), 183 (H,I,L,M,Q,R,T), 189 (C), 205 (C,F), 206 (F,H,I,T,V,Y), 207 (T), 210 (A,E,F,G,H,T), 212 (F,H,K,M,N,R,S,T), 213 (I,K,R,V,Y), 214 (Q), 218 (R), 223 (Y), 224 (I,R), 227 (C,E,G,K,Q,R,S,T,V), 235 (D,L,T), 236 (P), 237 (A,Q), 238 (A,C,D,E,R,S), 239 (C,G,H,L,Q,R,S,V,Y), 241 (E,F,G,I,T,V), 244 (Q), 246 (K,R), 248 (C,H), 249 (G,V), 250 (F,S), 251 (H), 252 (F,I,L), 253 (A,D,E,P), 254 (C,F,G,H,I,P), 255 (F,Q), 258 (F), 259 (I), 260 (C,D,I), 261 (K,R,T), 262 (C,F,H,L,P,R), 266 (W), 268 (F,R), 269 (P,T,W,Y), 270 (M,N,P,V), 271 (V), 272 (R), 273 (R), 274 (D,E), 276 (G,S), 278 (V), 279 (E), 280 (P,R,V), 282 (P), 283 (A,C,E,G,H,T,V), 294 (T), 295 (R), 296 (E,I), 297 (I,V), 300 (Q), 302 (W), 306 (Y), 310 (I,N), 및 312 (Q)를 포함하며, 여기서, 썬몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3에 제시된 썬몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

본 발명의 폴리펩티드

본 발명은 "본 발명의 폴리펩티드"로 총괄적으로 지칭될 수 있는, 신규한 폴리펩티드를 제공한다. 본 발명의 폴리펩티드는, 예를 들어, 효소 활성 (예를 들어, 썬몰리신 활성)을 갖는 변이체 썬몰리신 효소 폴리펩티드를 포함하여, 단리되거나, 재조합되거나, 실질적으로 순수하거나, 또는 비자연적으로 발생하는 변이체 썬몰리신 효소 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 폴리펩티드는 세정 응용에 유용하고 세정을 필요로 하는 물품 또는 표면 (예를 들어, 물품의 표면)을 세정하는 방법에 유용한 세정 조성물에 포함될 수 있다.

일부 실시 형태에서, 썬몰리신 효소 변이체는 바실러스 또는 제오바실러스 속으로부터의 모 썬몰리신 효소의 변이체일 수 있다. 서로에 대해 그리고 서열 번호 3에 나타난 바와 같은 썬몰리신 효소에 대해 높은 동일성을 갖는 다양한 썬몰리신 효소들이 바실러스 또는 제오바실러스 속에서 발견되어 왔다. 예를 들어, 실시예 4의 표 4.1 및 도 4.1을 참조한다. 다른 실시 형태에서, 썬몰리신 효소 변이체는 바실러스, 제오바실러스, 알리사이를로바실러스, 락토바실러스, 엑시구오박테리움, 브레비바실러스, 파에니바실러스, 헤르페토시폰, 오세아노바실러스, 쉬와넬라, 클로스트리듐, 스타필로코쿠스, 플라보박테리움, 스티그마텔라, 미소코쿠스, 비브리오, 메타노사르시나, 크리세오박테리움, 스트렙토마이세스, 크리벨라, 자니박터, 노카르디오이데스, 잔타모나스, 마이크로모노스포라, 부르크홀데리아, 테할로코코이데스, 크로세이박터, 코르디아, 마이크로실라, 썬모악티노마이세스, 클로로플렉서스, 리스테리아, 플레시오시스티스, 할리스코메노박터, 사이토파가, 하헬라, 아트로박터, 브라키박테리움, 클라비박터, 마이크로박테리움, 인트라스포란지움, 프란키아, 메이오씨머스, 슈도모나스, 리시누스, 카테눌리스포라, 아나바에나, 노스톡, 할로모나스, 크로모할로박터, 보르데텔라, 바리오보락스, 덕케야, 페토박테리움, 시트로박터, 엔테로박터, 살모넬라, 에르위니아, 판토에아, 라넬라, 세라티아, 제오더마토필루스, 쟈마타, 제노라브두스, 포토라브두스, 아스퍼질러스, 네오사르토리아, 피레노포라, 사카로폴리스포라, 벡트리아, 지베렐라, 메타리지움, 와들리아, 시아노테세, 셀룰파가, 프로비텐시아, 브라디리조비움, 아그로박테리움, 무실라기니박터, 세라티아, 소란지움, 스트렙토스포란지움, 레니박테리움, 아에로모나스, 레이네케아, 크로모박테리움, 모리텔라, 할리안지움, 칸지엘라, 마리노모나스, 비브리오오날레스, 리스토넬라, 살리니비브리오, 포토박테리움, 알테로모나달레스, 레지오넬라, 테레디니박터, 레이네케아, 하이드로제니비르가, 및 슈도알테로모나스로 이루어진 군으로부터 선택되는 속을 포함하는, 표 4.2에 열거된 속 중 임의의 것으로부터의 모 썬몰리신 효소의 변이체일 수 있다. 다양한 실시 형태에서, 썬몰리신 효소 변이체는 표 4.1 또는 표 4.2에 기재된 종 중 임의의 것으로부터의 모 썬몰리신 효소의 변이체일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 썬몰리신 효소 변이체는 바실러스, 제오바실러스, 알리사이를로바실러스, 락토바실러스, 엑시구오박테리움, 브레비바실러스, 파에니바실러스, 헤르페토시폰, 오세아노바실러스, 쉬와넬라, 클로스트리듐, 스타필로코쿠스, 플라보박테리움, 스티그마텔라, 미소코쿠스, 비브리오, 메타노사르시나, 크리세오박테리움, 및 슈도알테로모나스로 이루어진 군으로부터 선택되는

속의 모 씨몰리신의 변이체일 수 있다.

[0172] 일부 실시 형태에서, 씨몰리신 효소 변이체는 바실러스 또는 제오바실러스 속으로부터의 씨몰리신 효소에 대해 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 동일성을 갖는 변이체일 수 있다. 다양한 실시 형태에서, 씨몰리신 효소 변이체는 표 4.1에서의 임의의 속으로부터의 씨몰리신 효소에 대해 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 동일성을 갖는 변이체일 수 있다. 다양한 실시 형태에서, 씨몰리신 효소 변이체는 표 4.2에서의 임의의 속으로부터의 씨몰리신 효소에 대해 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100% 동일성을 갖는 변이체일 수 있다.

[0173] 특정 실시 형태에서, 본 발명은 바실러스 또는 제오바실러스 속으로부터 유래된 효소이다. 특정 실시 형태에서, 본 발명은 제오바실러스 칼도프로테올리티쿠스 종으로부터의 씨몰리신 효소로부터 유래된 효소이다.

[0174] 제오바실러스 칼도프로테올리티쿠스로부터 클로닝된 씨몰리신과 관련된 조성물 및 방법이 설명된다. 이러한 조성물 및 방법은, 클로닝되고 발현된 씨몰리신이 세제 조성물의 존재 하에서 단백질 분해 활성을 갖는다는 관찰에 부분적으로 기초한다. 씨몰리신은 또한 세제 조성물에서 우수한 안정성을 나타낸다. 씨몰리신의 이러한 특징으로 인해, 이는 세제 조성물에서 발견되는 계면활성제 및 다른 성분의 존재 하에서 효소가 단백질을 가수분해할 수 있는 다양한 세정 응용에서의 사용에 매우 적합하게 된다.

[0175] 일 태양에서, 본 발명의 조성물 및 방법은 변이체 씨몰리신 폴리펩티드를 제공한다. 모 씨몰리신 폴리펩티드는 (서열 번호 4)로부터 단리되었다. 성숙 씨몰리신 폴리펩티드는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는다. 유사하게, 실질적으로 동일한 씨몰리신 폴리펩티드는 자연에서, 예를 들어, 다른 균주들에서 또는 G. 칼도프로테올리티쿠스의 단리체에서 발생할 수 있다. 이러한 그리고 다른 재조합 씨몰리신 폴리펩티드는 본 발명의 조성물 및 방법에 포함된다.

[0176] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 단리되거나, 재조합되거나, 실질적으로 순수하거나, 또는 비자연적으로 발생하는, 씨몰리신 활성을 갖는 변이체 씨몰리신 효소를 포함하는데, 폴리펩티드는 본 명세서에 제공되는 바와 같은 모 씨몰리신 효소에 대해 약 85% 이상, 약 86% 이상, 약 87% 이상, 약 88% 이상, 약 89% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 약 99.5% 이상, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함한다.

[0177] 일부 실시 형태에서, 변이체 폴리펩티드는, 예시된 씨몰리신 폴리펩티드에 대해 특정된 정도의 아미노산 서열 상동성을 갖는, 예를 들어, 서열 번호 3 또는 서열 번호 4의 아미노산 서열에 대해 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 심지어 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 변이체이다. 상동성은, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같이, BLAST, ALIGN, 또는 CLUSTAL과 같은 프로그램을 사용하여 아미노산 서열 정렬에 의해 결정될 수 있다.

[0178] 씨몰리신 활성을 갖는 변이체 씨몰리신 효소를 암호화하는, 단리되거나, 재조합되거나, 실질적으로 순수하거나, 또는 비자연적으로 발생하는 서열이 또한 제공되는데, 상기 변이체 씨몰리신 효소 (예를 들어, 변이체 씨몰리신)는 서열 번호 4의 아미노산 서열과는 50개 이하, 40개 이하, 30개 이하, 35개 이하, 25개 이하, 20개 이하, 19개 이하, 18개 이하, 17개 이하, 16개 이하, 15개 이하, 14개 이하, 13개 이하, 12개 이하, 11개 이하, 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개 이하의 아미노산 잔기만큼 상이한 아미노산 서열을 포함하고, 변이체 씨몰리신의 아미노산 위치는 변이체 씨몰리신 효소 아미노산 서열과 제오바실러스 칼도프로테올리티쿠스 씨몰리신 아미노산 서열의 정렬에 의해 결정되는 바와 같이, 서열 번호 3에 나타난 씨몰리신의 아미노산 서열에서의 대응하는 아미노산 위치의 번호에 따라 번호가 매겨진다.

[0179] 상기에 언급한 바와 같이, 본 발명의 변이체 씨몰리신 효소 폴리펩티드는 효소 활성 (예를 들어, 씨몰리신 활성)을 가지며, 따라서, 식기류 물품, 식탁용 식기류 물품, 패브릭, 및 경질 표면을 갖는 물품 (예를 들어, 식탁, 식탁 윗면, 벽, 가구 물품, 바닥, 천장 등의 경질 표면)을 세정하는 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는 세정 응용에 유용하다. 본 발명의 하나 이상의 변이체 씨몰리신 효소 폴리펩티드를 포함하는 예시적인 세정 조성물이 아래에서 설명된다. 본 발명의 변이체 씨몰리신 효소 폴리펩티드의 효소 활성 (예를 들어, 씨몰리신 효소 활성)은, 당업자에게 공지된 절차를 사용하여 용이하게 결정될 수 있다. 아래에 제시된 실시예는 효소 활성, 세정 성능, 세제 안정성 및/또는 열 안정성을 평가하기 위한 방법을 설명한다. 열룩(예를 들어, 지방 열룩)의 제거, 경질 표면의 세정, 또는 세탁물, 식기류 또는 식탁용 식기류 물품(들)의 세정에 있어서 본 발명의 변이체 씨몰리신 효소의 성능은 본 기술 분야에 공지된 절차를 사용하고/하거나 실시예에 제시된 절차를 사용함

으로써 용이하게 결정될 수 있다.

[0180] 본 발명의 폴리펩티드는, 폴리펩티드의 효소 활성을 실질적으로 변경하지 않는 변화의 경우를 포함하여, 보존적 또는 비보존적인, 하나 이상의 아미노산 삽입, 결실, 및/또는 치환과 같은 다양한 변화를 겪을 수 있다. 유사하게, 본 발명의 핵산은 또한, 특정 코돈이 동일하거나 상이한 아미노산을 암호화하여 침묵 변이(silent variation)(예를 들어, 예컨대 암호화된 아미노산이 핵산 돌연변이에 의해 변경되지 않은 경우, 뉴클레오티드 서열에서의 돌연변이가 아미노산 서열에서의 침묵 돌연변이를 야기함) 또는 비침묵 변이를 야기하도록 하는 하나 이상의 코돈에서의 하나 이상의 핵산의 하나 이상 치환, 서열에서 하나 이상의 핵산 (또는 코돈)의 하나 이상의 결실, 서열에서 하나 이상의 핵산 (또는 코돈)의 하나 이상의 첨가 또는 삽입, 및/또는 서열에서 하나 이상의 핵산 (또는 코돈)의 분할 또는 하나 이상의 절단(truncation)과 같은 다양한 변화를 겪을 수 있다. 핵산 서열에서의 많은 그러한 변화는 원래의 핵산 서열에 의해 암호화된 변이체 썬몰리신 효소와 비교하여, 생성된 암호화된 변이체 썬몰리신 효소의 효소 활성을 실질적으로 변경하지 않을 수 있다. 본 발명의 핵산은 또한 발현 시스템(예를 들어, 박테리아 발현 시스템)에서 최적의 발현을 제공하는 하나 이상의 코돈을 포함하도록 변형될 수 있는 한편, 원한다면, 상기 하나 이상의 코돈은 여전히 동일한 아미노산을 암호화한다.

[0181] 일부 실시 형태에서, 본 발명은, 본 명세서에 기재된 아미노산 치환을 갖는 서열을 포함하고 또한 보존적 및 비보존적 치환과 같은 하나 이상의 추가적인 아미노산 치환을 포함하는, 원하는 효소 활성(예를 들어, 썬몰리신 효소 활성 또는 세정 성능 활성)을 갖는 변이체 썬몰리신 효소 폴리펩티드를 포함하는 폴리펩티드의 속을 제공하는데, 여기서 폴리펩티드는 원하는 효소 활성(예를 들어, 변이체 썬몰리신 효소의 세정 활성 또는 성능에 반영되는 바와 같은, 썬몰리신 효소 활성 또는 단백질 분해 활성)을 나타내거나, 유지하거나, 또는 대략적으로 유지한다. 본 발명에 따른 아미노산 치환은 하나 이상의 비보존적 치환 및/또는 하나 이상의 보존적 아미노산 치환을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 보존적 아미노산 잔기 치환은 전형적으로 아미노산 잔기의 하나의 기능적 부류 내의 구성원을 동일한 기능적 부류에 속하는 잔기와 교환하는 것을 포함한다 (동일한 아미노산 잔기는 기능적으로 상동성인 것으로 또는 퍼센트 기능적 상동성의 계산 시 보존된 것으로 간주된다). 보존적 아미노산 치환은 전형적으로 아미노산 서열에서 아미노산을 기능적으로 유사한 아미노산으로 치환하는 것을 포함한다. 예를 들어, 알라닌, 글리신, 세린, 및 트레오닌은 기능적으로 유사하므로 서로에 대해 보존적 아미노산 치환으로서 역할을 할 수 있다. 아스파르트산 및 글루탐산은 서로에 대해 보존적 치환으로서 역할을 할 수 있다. 아스파라긴 및 글루타민은 서로에 대해 보존적 치환으로서 역할을 할 수 있다. 알지닌, 라이신, 및 히스티딘은 서로에 대해 보존적 치환으로서 역할을 할 수 있다. 아이소류신, 류신, 메티오닌, 및 발린은 서로에 대해 보존적 치환으로서 역할을 할 수 있다. 페닐알라닌, 타이로신, 및 트립토판은 서로에 대해 보존적 치환으로서 역할을 할 수 있다.

[0182] 다른 보존적 아미노산 치환 그룹들이 구상될 수 있다. 예를 들어, 아미노산은 유사한 기능 또는 화학적 구조 또는 조성 (예를 들어, 산성, 염기성, 지방족, 방향족, 황-함유)에 따라 그룹화될 수 있다. 예를 들어, 지방족 그룹은: 글리신 (G), 알라닌 (A), 발린 (V), 류신 (L), 아이소류신 (I)을 포함할 수 있다. 서로에 대해 보존적 치환으로 간주되는 아미노산을 포함하는 다른 그룹에는: 방향족: 페닐알라닌 (F), 타이로신 (Y), 트립토판 (W); 황-함유: 메티오닌 (M), 시스테인 (C); 염기성: 알지닌 (R), 라이신 (K), 히스티딘 (H); 산성: 아스파르트산 (D), 글루탐산 (E); 비극성의, 하전되지 않은 잔기: 시스테인 (C), 메티오닌 (M), 및 프롤린 (P); 친수성의, 하전되지 않은 잔기: 세린 (S), 트레오닌 (T), 아스파라긴 (N), 및 글루타민 (Q)이 포함된다. 추가적인 아미노산 그룹이 당업자에게 공지되어 있고 다양한 표준 교과서에 기재되어 있다. 본 명세서에서의 폴리펩티드 서열의 목록은, 상기 치환 그룹과 함께, 모든 보존적으로 치환된 폴리펩티드 서열의 명확한 목록을 제공한다.

[0183] 더 보존적인 치환이 상기한 아미노산 잔기 클래스 내에 존재하고, 이는 또한 또는 대안적으로 적합할 수 있다. 더 보존적인 치환을 위한 보존 그룹은: 발린-류신-아이소류신, 페닐알라닌-타이로신, 라이신-알지닌, 알라닌-발린, 및 아스파라긴-글루타민을 포함한다.

[0184] 본 발명의 폴리펩티드 서열의 보존적으로 치환된 변이체 (예를 들어, 본 발명의 변이체 프로테아제)는, 동일한 보존적 치환 그룹의 보존적으로 선택되는 아미노산에 의한, 폴리펩티드 서열의 아미노산 중 작은 백분율, 때때로 25%, 20%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 또는 6% 미만의 치환, 또는 5%, 4%, 3%, 2%, 또는 1% 미만의 치환, 또는 폴리펩티드 서열의 아미노산 중 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개 미만의 아미노산 치환을 포함한다.

[0185] 본 명세서의 다른 곳에서 더욱 상세하게 그리고 본 명세서에 제공된 실시예에 기재된 바와 같이, 본 발명의 폴리펩티드는, 공지된 메탈로프로테아제를 포함하는 공지된 프로테아제와 비교될 수 있는 세정 능력을 가질 수 있

다.

[0186] 일부 실시 형태에서, 프로테아제 변이체는 하나 이상의 돌연변이를 포함하며, 제오바실러스 칼도프로테올리티쿠스 씨몰리신 (서열 번호 3)에 비해 -5, -4, -3, -2, -1, 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5의 총 알짜 전하를 갖는다.

[0187] 일부 실시 형태에서, 상기 고 이온 강도 씨몰리신 프로테아제 변이체는, 전형적으로 세탁기 내에서, 물로 희석되어 세탁 세제 세척액을 형성하는 세제 조성물의 일부를 형성하는데, 그의 전도도는 약 3 mS/cm 내지 약 30 mS/cm, 약 3.5 mS/cm 내지 약 20 mS/cm, 또는 심지어 약 4 mS/cm 내지 약 10 mS/cm이다.

[0188] 씨몰리신 프로테아제 변이체의 전하는 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 제오바실러스 칼도프로테올리티쿠스 씨몰리신 프로테아제 야생형과 비교하여 표시된다. 단일 음전하를 부여하는 아미노산은 D 및 E이고, 단일 양전하를 부여하는 아미노산은 R, H 및 K이다. 전하를 변화시키는, 서열 번호 2와 대비한 임의의 아미노산 변화를 사용하여 씨몰리신 프로테아제 변이체의 전하를 계산한다. 예를 들어, 야생형 중성 위치로부터 음전하 돌연변이를 도입하는 것은 -1의 알짜 전하를 씨몰리신 프로테아제 변이체에 부가하는 반면, 야생형 양성 아미노산 잔기 (R, H 또는 K)로부터 음전하 돌연변이 (D 또는 E)를 도입하는 것은 -2의 알짜 전하를 부가할 것이다. 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 제오바실러스 칼도프로테올리티쿠스 씨몰리신 프로테아제 야생형에 대비해 프로테아제 변이체에 대한 상이한 모든 아미노산 잔기로부터의 전하 변화의 합계는 프로테아제 변이체의 전하 변화를 제공한다. 전하를 정확하게 선택함으로써, 예상치 못하게 개선된 수준의 씨몰리신 세정 성능이 얻어질 수 있다. "저 전도성 세탁 세제 용액"은, 약 0.1 mS/cm 내지 약 3 mS/cm, 약 0.3 mS/cm 내지 약 2.5 mS/cm, 또는 심지어 약 0.5 mS/cm 내지 약 2 mS/cm의 전도도를 갖는 것으로서 정의된다. "고 전도성 세탁 세제 용액"은, 약 3 mS/cm 내지 약 30 mS/cm, 약 3.5 mS/cm 내지 약 20 mS/cm, 또는 심지어 약 4 mS/cm 내지 약 10 mS/cm의 전도도를 갖는 것으로서 정의된다. 상기 예는 비제한적인 것으로 의도된다. 일단 돌연변이들이 씨몰리신 성능을 최적화하도록 조합되면, 효소 전하는 또한 추가의 위치들에서의 돌연변이들에 의해 균형을 이룰 수 있다.

[0189] 일부 실시 형태에서, 본 발명은, 단백질 분해 활성을 갖는 단리되거나, 재조합되거나, 실질적으로 순수하거나, 또는 비자연적으로 발생하는 변이체 프로테아제 (예를 들어, 변이체 씨몰리신)를 제공하는데, 상기 변이체 프로테아제는 서열 번호 3에 나타난 아미노산 서열과 50개 이하, 45개 이하, 40개 이하, 35개 이하, 30개 이하, 25개 이하, 20개 이하, 19개 이하, 18개 이하, 17개 이하, 16개 이하, 15개 이하, 14개 이하, 13개 이하, 12개 이하, 11개 이하, 10개 이하, 9개 이하, 또는 8개 이하의 아미노산 잔기만큼 상이한 아미노산 서열을 포함하며, 아미노산 위치는, 변이체 프로테아제 아미노산 서열과 제오바실러스 칼도프로테올리티쿠스 씨몰리신 아미노산 서열의 정렬에 의해 결정되는 바와 같이, 서열 번호 3에 나타난 제오바실러스 칼도프로테올리티쿠스 씨몰리신의 아미노산 서열에서의 대응하는 아미노산 위치의 번호에 따라 번호가 매겨진다.

[0190] 일부 실시 형태에서, 본 발명은, 단백질 분해 활성을 갖는 단리되거나, 재조합되거나, 실질적으로 순수하거나, 또는 비자연적으로 발생하는 변이체 프로테아제 (예를 들어, 변이체 씨몰리신)를 제공하는데, 상기 변이체 프로테아제는 서열 번호 2에 나타난 아미노산 서열과 50개 이하, 45개 이하, 40개 이하, 35개 이하, 30개 이하, 25개 이하, 20개 이하, 19개 이하, 18개 이하, 17개 이하, 16개 이하, 15개 이하, 14개 이하, 13개 이하, 12개 이하, 11개 이하, 10개 이하, 9개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하의 아미노산 잔기만큼 상이한 아미노산 서열을 포함하며, 아미노산 위치는, 변이체 프로테아제 아미노산 서열과 제오바실러스 칼도프로테올리티쿠스 씨몰리신 아미노산 서열의 정렬에 의해 결정되는 바와 같이, 서열 번호 3에 나타난 제오바실러스 칼도프로테올리티쿠스 씨몰리신의 아미노산 서열에서의 대응하는 아미노산 위치의 번호에 따라 번호가 매겨진다.

본 발명의 핵산

[0191] 본 발명은, 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는, 총괄적으로 "본 발명의 핵산" 또는 "본 발명의 폴리뉴클레오티드"로 지칭될 수 있는, 단리되거나, 비자연적으로 발생하거나, 재조합된 핵산 (본 명세서에서 "폴리뉴클레오티드"로도 지칭됨)을 제공한다. 하기에 기재된 모두를 포함하는, 본 발명의 핵산은 전형적으로 관심 폴리펩티드 또는 이의 단편을 암호화하는 서열을 포함하는 플라스미드 발현 벡터의 발현을 통한, 본 발명의 폴리펩티드의 재조합 생산 (예를 들어, 발현)에 유용하다. 상기에 논의된 바와 같이, 폴리펩티드는 세정을 필요로 하는 물품 또는 표면 (예를 들어, 물품의 표면)을 세정하기 위한 세정 용용 및 세정 조성물에 유용한 효소 활성 (예를 들어, 단백질 분해 활성)을 갖는 변이체 씨몰리신 폴리펩티드를 포함하는 변이체 프로테아제 폴리펩티드를 포함한다.

[0193] 일부 실시 형태에서, 본 발명은, "본 발명의 폴리펩티드"라는 제목의 섹션 및 본 명세서의 다른 곳에서 상기에

기재된 본 발명의 (임의의 융합 단백질 등을 포함하는) 임의의 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 단리되거나, 재조합되거나, 실질적으로 순수하거나, 또는 비자연적으로 발생하는 핵산을 제공한다. 본 발명은 또한, 상기에 그리고 본 명세서의 다른 곳에 기재된 본 발명의 임의의 폴리펩티드들 중 둘 이상의 조합을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 단리되거나, 재조합되거나, 실질적으로 순수하거나, 또는 비자연적으로 발생하는 핵산을 제공한다.

[0194] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 씨몰리신 활성을 갖는, 단리되거나, 재조합되거나, 실질적으로 순수하거나, 또는 비자연적으로 발생하는 변이체 씨몰리신 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는데, 폴리펩티드는 본 명세서에 제공된 바와 같은 모 씨몰리신 효소에 대해 약 85% 이상, 약 86% 이상, 약 87% 이상, 약 88% 이상, 약 89% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 약 99% 이상, 약 99.5% 이상, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드 서열을 포함한다.

[0195] 일부 실시 형태에서, 변이체 폴리펩티드는, 예시된 씨몰리신 폴리펩티드에 대해 특정된 정도의 아미노산 서열 상동성을 갖는, 예를 들어, 서열 번호 3 또는 서열 번호 4의 아미노산 서열에 대해 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 또는 심지어 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 변이체이다. 상동성은, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같이, BLAST, ALIGN, 또는 CLUSTAL과 같은 프로그램을 사용하여, 아미노산 서열 정렬에 의해 결정될 수 있다.

[0196] 단백질 분해 활성을 갖는 변이체 프로테아제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는, 단리되거나, 재조합되거나, 실질적으로 순수하거나, 또는 비자연적으로 발생하는 핵산이 또한 제공되는데, 상기 변이체 프로테아제 (예를 들어, 변이체 씨몰리신)는, 서열 번호 2의 아미노산 서열과 50개 이하, 40개 이하, 30개 이하, 35개 이하, 25개 이하, 20개 이하, 19개 이하, 18개 이하, 17개 이하, 16개 이하, 15개 이하, 14개 이하, 13개 이하, 12개 이하, 11개 이하, 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개, 또는 1개 이하의 아미노산 잔기만큼 상이한 아미노산 서열을 포함하고, 변이체 씨몰리신의 아미노산 위치는, 변이체 프로테아제 아미노산 서열과 제오바실러스 칼도프로테올리티쿠스 씨몰리신 아미노산 서열의 정렬에 의해 결정되는 바와 같이, 서열 번호 3에 나타난 제오바실러스 칼도프로테올리티쿠스 씨몰리신의 아미노산 서열에서의 대응하는 아미노산 위치의 번호에 따라 번호가 매겨진다.

[0197] 본 발명은, 제오바실러스 또는 바실러스 씨몰리신의 씨몰리신 변이체를 암호화하는 핵산을 제공하는데, 씨몰리신 변이체는 단백질 분해 활성을 갖는 성숙 형태이며, 본 명세서 전반에 열거된 바와 같은 아미노산 치환들의 조합을 포함하는 아미노산 서열을 포함하고, 씨몰리신 변이체의 아미노산 위치는 서열 번호 3으로 제시된 제오바실러스 칼도프로테올리티쿠스 씨몰리신의 아미노산 서열에 대응하여 번호가 매겨진다.

[0198] 본 발명의 핵산은 임의의 적합한 합성, 조작, 및/또는 단리 기술, 또는 이들의 조합을 이용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 표준 핵산 합성 기술, 예를 들어 당업자에게 공지된 고상 합성 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 그러한 기술에서는, 최대 50개 이상의 뉴클레오티드 염기의 단편들을 전형적으로 합성하고, 이어서, (예를 들어, 효소적 또는 화학적 라이게이션 방법, 또는 폴리머라제 매개 재조합 방법에 의해) 연결하여 본질적으로 임의의 원하는 연속 핵산 서열을 형성한다. 본 발명의 핵산의 합성은 또한, 자동화된 합성 방법에서 전형적으로 실행되는 바와 같은, 고전적인 포스포라미다이트 방법 (예를 들어, 문헌 [Beaucage *et al.*, Tetrahedron Letters 22:1859-69 [1981]] 참조); 또는 매테스(Matthes) 등에 의해 설명된 방법 (문헌[Matthes *et al.*, EMBO J. 3:801-805 [1984]] 참조)을 사용하는 화학적 합성을 포함하지만, 이에 한정 되지는 않는, 본 기술 분야에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 촉진될 (또는 대안적으로 달성될) 수 있다. 본 발명의 핵산은 또한 자동 DNA 합성기를 사용하여 생산될 수 있다. 맞춤형 핵산은 다양한 상업적 공급자(예를 들어, 더 미드랜드 서티파이드 리에이전트 컴퍼니(The Midland Certified Reagent Company), 더 그레이트 아메리칸 진 컴퍼니(the Great American Gene Company), 오페론 테크놀로지스 인크.(Operon Technologies Inc.), 및 DNA2.0)에 주문될 수 있다. 핵산을 합성하기 위한 다른 기술들 및 관련 원리들이 본 기술 분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌[Itakura *et al.*, Ann. Rev. Biochem. 53:323 [1984]]; 및 문헌[Itakura *et al.*, Science 198:1056 [1984]] 참조).

[0199] 상기에 나타낸 바와 같이, 핵산의 변형에 유용한 재조합 DNA 기술은 본 기술 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 제한 엔도뉴클레아제 소화, 라이게이션, 역전사 및 cDNA 생산, 및 폴리머라제 연쇄 반응 (예를 들어, PCR)과 같은 기술이 알려져 있으며, 당업자에 의해 용이하게 이용된다. 본 발명의 뉴클레오티드는 또한, 본 발명의 변이체 프로테아제 폴리펩티드(들)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 혼성화되거나 그를 PCR-증폭할 수 있

는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 탐침을 사용하여, cDNA 라이브러리 (예를 들어, 본 명세서에 기재된 것들을 포함하는, 본 기술 분야에서 보통 사용되는 돌연변이 유발 기술을 사용하여 생성되는 cDNA 라이브러리)를 스크리닝함으로써 얻어질 수 있다. cDNA 클론을 스크리닝하고 단리하는 절차 및 PCR 증폭 절차는 당업자에게 공지되어 있으며 당업자에게 공지된 표준 참고 문헌에 기재되어 있다. 본 발명의 일부 핵산은, 예를 들어, 공지의 돌연변이 유발 절차 (예를 들어, 부위-지정 돌연변이 유발(site-directed mutagenesis), 부위 포화 돌연변이 유발(site saturation mutagenesis), 및 시험관 내 재조합)에 의해, (예를 들어, 효소 또는 모 프로테아제를 암호화하는) 자연 발생 폴리뉴클레오티드 골격을 변경함으로써 얻어질 수 있다.

[0200] 본 발명의 변이체 프로테아제의 제조 방법

본 발명의 변이체 프로테아제를 암호화하는 본 발명의 변이체 폴리뉴클레오티드를 생성하기에 적합한 다양한 방법, 예를 들어, 부위-포화 돌연변이 유발, 스캐닝 돌연변이 유발, 삽입 돌연변이 유발, 결실 돌연변이 유발, 랜덤 돌연변이 유발, 부위-지정 돌연변이 유발, 및 지정-진화(directed-evolution)뿐만 아니라 다양한 다른 재조합 접근법을 포함하지만 이에 한정되지는 않는 방법이 본 기술 분야에 공지되어 있다. 변이체 폴리뉴클레오티드 및 단백질 (예를 들어, 변이체 프로테아제)의 제조 방법에는, DNA 셔플링(shuffling) 방법, 유전자의 비상동성 재조합에 기초한 방법, 예를 들어, ITCY (문헌[Ostermeier *et al.*, 7:2139-44 [1999]] 참조), SCRACHY (문헌[Lutz *et al.*, 98:11248-53 [2001]] 참조), SHIPREC (문헌[Sieber *et al.*, 19:456-60 [2001]] 참조), 및 NRR (문헌[Bittker *et al.*, 20:1024-9 [2001]]; 문헌[Bittker *et al.*, 101:7011-6 [2004]] 참조), 및 무작위 및 표적 돌연변이, 결실 및/또는 삽입을 삽입하기 위한 올리고뉴클레오티드의 사용에 의존하는 방법 (문헌[Ness *et al.*, 20:1251-5 [2002]]; 문헌[Coco *et al.*, 20:1246-50 [2002]]; 문헌[Zha *et al.*, 4:34-9 [2003]]; 문헌[Glaser *et al.*, 149:3903-13 [1992]] 참조)이 포함된다.

[0202] 본 발명의 변이체 프로테아제를 생산하기 위한 벡터, 세포, 및 방법

본 발명은, 본 명세서에 기재된 본 발명의 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 본 명세서에 기재된 본 발명의 변이체 프로테아제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드)를 포함하는 단리되거나 재조합된 벡터, 본 발명의 적어도 하나의 핵산 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리되거나 재조합된 발현 벡터 또는 발현 카세트, 본 발명의 적어도 하나의 핵산 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리되거나, 실질적으로 순수하거나, 또는 재조합된 DNA 작제물, 본 발명의 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리되거나 재조합된 세포, 본 발명의 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포를 포함하는 세포 배양물, 본 발명의 적어도 하나의 핵산 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포 배양물, 및 하나 이상의 그러한 벡터, 핵산, 발현 벡터, 발현 카세트, DNA 작제물, 세포, 세포 배양물, 또는 이들의 임의의 조합 또는 혼합물을 포함하는 조성물을 제공한다.

일부 실시 형태에서, 본 발명은, 본 발명의 적어도 하나의 핵산 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 본 발명의 적어도 하나의 벡터 (예를 들어, 발현 벡터 또는 DNA 작제물)를 포함하는 재조합 세포를 제공한다. 일부 그러한 재조합 세포는 그러한 적어도 하나의 벡터에 의해 형질전환되거나 또는 형질주입된다. 그러한 세포는 전형적으로 숙주 세포로 지칭된다. 일부 그러한 세포는 바실러스 종 세포, 예를 들어, B. 서브틸리스 세포를 포함하지만 이에 한정되지 않는 박테리아 세포를 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명의 적어도 하나의 변이체 프로테아제를 포함하는 재조합 세포 (예를 들어, 재조합 숙주 세포)를 제공한다.

일부 실시 형태에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다. 일부 실시 형태에서, 벡터는, 본 발명의 변이체 프로테아제를 암호화하는 본 발명의 폴리뉴클레오티드 서열이, 효율적인 유전자 발현에 필요한 하나의 또는 추가적인 핵산 세그먼트에 작동가능하게 연결되는 발현 벡터 또는 발현 카세트 (예를 들어, 본 발명의 변이체 프로테아제를 암호화하는 본 발명의 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결되는 프로모터)이다. 벡터는 전사 종결자 및/또는 선택 유전자, 예를 들어, 항미생물제-함유 배지에서의 성장에 의해 플라스미드-감염 숙주 세포의 연속적인 배양 유지를 가능하게 하는 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있다.

발현 벡터는 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유래될 수 있거나, 또는 대안적인 실시 형태에서, 둘 모두의 요소를 포함한다. 예시적인 벡터에는 pXX, pC194, pJH101, pE194, pHPI3이 포함되지만 이에 한정되지 않는다 (문헌[Harwood and Cutting [eds.], Chapter 3, Molecular Biological Methods for *Bacillus*, John Wiley & Sons [1990]; B. 서브틸리스에 적합한 복제 플라스미드는 p. 92에 나열된 것들을 포함함] 참조; 또한 문헌[Perego, Integrational Vectors for Genetic Manipulations in *Bacillus subtilis*, in Sonenshein *et al.*, [eds.] *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, American Society for Microbiology, Washington, D.C. [1993], pp. 615-624] 참조).

[0207]

세포 내에서의 관심 단백질 (예를 들어, 변이체 프로테아제)의 발현 및 생산을 위해, 변형된 프로테아제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 적어도 하나의 카페를 포함하는 그리고 바람직하게는 다수의 카페들을 포함하는 적어도 하나의 발현 벡터가 프로테아제의 발현에 적합한 조건 하에서 세포 내로 형질전환된다. 본 발명의 일부 실시 형태에서, 변이체 프로테아제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열은 (벡터 내에 포함된 다른 서열과 더불어) 숙주 세포의 게놈 내로 통합되는 한편, 다른 실시 형태에서는, 변이체 프로테아제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 플라스미드 벡터가 세포 내에 자율적 염색체 외 요소로서 남아 있다. 본 발명은 염색체 외 혁신 요소뿐만 아니라, 숙주 세포 게놈 내로 통합되는 인커밍(incoming) 뉴클레오티드 서열 둘 모두를 제공한다. 본 명세서에 기재된 벡터는 본 발명의 변이체 프로테아제의 생산에 유용하다. 일부 실시 형태에서, 변이체 프로테아제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 작제물은 변이체 프로테아제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 박테리아 염색체 내로의 통합 및 선택적인 증폭을 가능하게 하는 통합 벡터 상에 존재한다. 통합을 위한 부위의 예는 당업자에게 공지되어 있다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 변이체 프로테아제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 전사는 선택된 전구 프로테아제에 대한 야생형 프로모터인 프로모터에 의해 유발된다. 일부 다른 실시 형태에서, 프로모터는 전구 프로테아제에 대해 이종이지만, 숙주 세포 내에서 기능적이다. 구체적으로, 박테리아 숙주 세포에서 사용하기에 적합한 프로모터의 예에는, 예를 들어, amyE, amyQ, amyL, pstS, sacB, pSPAC, pAprE, pVeg, pHpaII 프로모터, B. 스테아로씨모필루스 말토제닉 아밀라제 유전자, B. 아밀로리퀴파시엔스 (BAN) 아밀라제 유전자, B. 서브틸리스 알칼리 프로테아제 유전자, B. 클라우시 알칼리 프로테아제 유전자, B. 푸밀리스 (*B. pumilis*) 자일로시다제 유전자, B. 써린지엔시스 cryIIIA, 및 B. 리체니포르미스 알파-아밀라제 유전자의 프로모터가 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 추가적인 프로모터에는 A4 프로모터뿐만 아니라, 파지 람다 P_R 또는 P_L 프로모터, 및 대장균(*E. coli*) lac, trp 또는 tac 프로모터가 포함되지만 이에 한정되지 않는다.

[0208]

본 발명의 변이체 프로테아제는 박테리아 및 진균을 포함하는 임의의 적합한 그람-양성 미생물의 숙주 세포에서 생산될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시 형태에서, 변이체 프로테아제는 진균 및/또는 박테리아 기원의 숙주 세포에서 생산된다. 일부 실시 형태에서, 숙주 세포는 바실러스 종, 스트렙토마이세스 종, 에쉐리키아 (*Escherichia*) 종 또는 아스퍼질러스 종이다. 일부 실시 형태에서, 변이체 프로테아제는 바실러스 종 숙주 세포에 의해 생산된다. 본 발명의 변이체 프로테아제의 생산에 사용되는 바실러스 종 숙주 세포의 예에는 B. 리체니포르미스, B. 렌투스, B. 서브틸리스, B. 아밀로리퀴파시엔스, B. 렌투스, B. 브레비스, B. 스테아로씨모필루스, B. 알칼로필루스, B. 코아글란스, B. 서클란스, B. 푸밀리스, B. 써린지엔시스, B. 클라우시, 및 B. 메가테리움뿐만 아니라, 바실러스 속의 다른 유기체가 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, B. 서브틸리스 숙주 세포는 변이체 프로테아제의 생산을 위해 사용된다. 미국 특허 제5,264,366호 및 제4,760,025호 (RE 34,606)는 본 발명의 변이체 프로테아제를 생산하기 위해 사용될 수 있는 다양한 바실러스 숙주 균주를 기재하지만, 다른 적합한 균주도 사용될 수 있다.

[0209]

본 발명의 변이체 프로테아제를 생산하는데 사용될 수 있는 몇몇 산업적 박테리아 균주는 자연 발생 균주 및/또는 재조합 균주의 변이체뿐만 아니라, 비재조합 (즉, 야생형) 바실러스 종 균주를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 숙주 균주는 재조합 균주이고, 관심 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 숙주 내로 도입되어 있다. 일부 실시 형태에서, 숙주 균주는 B. 서브틸리스 숙주 균주이고, 특히 재조합 바실러스 서브틸리스 숙주 균주이다. 수많은 B. 서브틸리스 균주가 공지되어 있는데, 예를 들어, 1A6 (ATCC 39085), 168 (1A01), SB19, W23, Ts85, B637, PB1753 내지 PB1758, PB3360, JH642, 1A243 (ATCC 39,087), ATCC 21332, ATCC 6051, MI113, DE100 (ATCC 39,094), GX4931, PBT 110, 및 PEP 211 균주 (예를 들어, 문헌 [Hoch *et al.*, Genetics 73:215-228 [1973]] 참조; 또한, 각각이 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되는 미국 특허 제4,450,235호 및 제4,302,544호, 및 유럽 특허 EP 0134048호 참조)를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 발현 숙주 세포로서의 B. 서브틸리스의 사용이 본 기술 분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Palva *et al.*, Gene 19:81-87 [1982]]; 문헌 [Fahnestock and Fischer, J. Bacteriol., 165:796-804 [1986]]; 및 문헌 [Wang *et al.*, Gene 69:39-47 [1988]] 참조).

[0210]

일부 실시 형태에서, 바실러스 숙주 세포는, 하기 유전자들 중 적어도 하나에 돌연변이 또는 결실을 포함하는 바실러스 종이다: degU, degS, degR 및 degQ. 바람직하게는, 돌연변이는 degU 유전자에 있고, 더욱 바람직하게는, 돌연변이는 degU(Hy)32에 있다 (예를 들어, 문헌 [Msadek *et al.*, J. Bacteriol. 172:824-834 [1990]]; 및 문헌 [Olmos *et al.*, Mol. Gen. Genet. 253:562-567 [1997]] 참조). 하나의 적합한 숙주 균주는 degU32(Hy) 돌연변이를 옮기는 바실러스 서브틸리스이다. 일부 실시 형태에서, 바실러스 숙주는 scoC4 (예를 들어, 문헌 [Caldwell *et al.*, J. Bacteriol. 183:7329-7340 [2001]] 참조); spoIIE (예를 들어, 문헌 [Arigoni *et al.*,

Mol. Microbiol. 31:1407-1415 [1999]] 참조); 및/또는 oppA 또는 opp 오폐론의 다른 유전자 (예를 들어, 문헌 [Perego *et al.*, Mol. Microbiol. 5:173-185 [1991]] 참조)에 돌연변이 또는 결실을 포함한다. 실제로, oppA 유전자에서의 돌연변이와 동일한 표현형을 야기하는 opp 오폐론에서의 임의의 돌연변이가 본 발명의 변경된 바실러스 균주의 일부 실시 형태에서 사용될 것으로 고려된다. 일부 실시 형태에서, 이러한 돌연변이는 단독으로 발생되는 한편, 다른 실시 형태에서는, 돌연변이들의 조합이 존재한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 변이체 프로테아제를 생산하는 데 사용될 수 있는 변경된 바실러스 숙주 세포주는 전술한 유전자들 중 하나 이상에서 이미 돌연변이를 포함하는 바실러스 숙주 균주이다. 또한, 내인성 프로테아제 유전자의 돌연변이(들) 및/또는 결실을 포함하는 바실러스 종 숙주 세포가 사용된다. 일부 실시 형태에서, 바실러스 숙주 세포는 aprE 및 nprE 유전자의 결실을 포함한다. 다른 실시 형태에서, 바실러스 종 숙주 세포는 5개의 프로테아제 유전자의 결실을 포함하는 한편, 다른 실시 형태에서, 바실러스 종 숙주 세포는 9개의 프로테아제 유전자의 결실을 포함한다 (예를 들어, 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 출원 공개 제2005/0202535호 참조).

[0211] 숙주 세포는 본 기술 분야에 공지된 임의의 적합한 방법을 사용하여 본 발명의 적어도 하나의 변이체 프로테아제를 암호화하는 적어도 하나의 핵산에 의해 형질전환된다. 핵산이 벡터 내로 포함되든 또는 플라스미드 DNA의 존재없이 사용되든, 일부 실시 형태에서, 이는 전형적으로 미생물, 바람직하게는 대장균 세포 또는 컴피턴트 (competent) 바실러스 세포 내로 도입된다. 플라스미드 DNA 작제물 또는 벡터를 사용하고 그러한 플라스미드 DNA 작제물 또는 벡터를 바실러스 세포 또는 대장균 세포 내로 형질전환시켜 핵산 (예를 들어, DNA)을 그러한 세포 내로 도입하는 방법이 공지되어 있다. 일부 실시 형태에서, 플라스미드는 후속하여 대장균 세포로부터 단리되고, 바실러스 세포 내로 형질전환된다. 그러나, 대장균과 같은 중개 미생물을 사용하는 것은 필수적인 것은 아니며, 일부 실시 형태에서, DNA 작제물 또는 벡터가 바실러스 숙주 내로 직접 도입된다.

[0212] 당업자는 본 발명의 핵산 또는 폴리뉴클레오티드 서열을 바실러스 세포 내로 도입하는 적합한 방법을 잘 알고 있다 (예를 들어, 문헌[Ferrari *et al.*, "Genetics," in Harwood *et al.* [eds.], *Bacillus*, Plenum Publishing Corp. [1989], pp. 57-72]; 문헌[Saunders *et al.*, J. Bacteriol. 157:718-726 [1984]]; 문헌[Hoch *et al.*, J. Bacteriol. 93:1925 -1937 [1967]]; 문헌[Mann *et al.*, Current Microbiol. 13:131-135 [1986]]; 문헌[Holubova, Folia Microbiol. 30:97 [1985]]; 문헌[Chang *et al.*, Mol. Gen. Genet. 168:11-115 [1979]]; 문헌[Vorobjeva *et al.*, FEMS Microbiol. Lett. 7:261-263 [1980]]; 문헌[Smith *et al.*, Appl. Env. Microbiol. 51:634 [1986]]; 문헌[Fisher *et al.*, Arch. Microbiol. 139:213-217 [1981]]; 및 문헌[McDonald, J. Gen. Microbiol. 130:203 [1984]] 참조). 실제로, 원형질체 형질전환 및 회합(congression), 형질도입, 및 원형질체 융합을 포함하는 형질전환과 같은 방법은 공지되어 있고 본 발명에서의 사용에 적합하다. 형질전환 방법은 본 발명의 변이체 프로테아제를 암호화하는 핵산을 포함하는 DNA 작제물 또는 벡터를 숙주 세포 내로 도입하는데 사용된다. 본 기술 분야에 공지된, 바실러스 세포를 형질전환하는 방법은, 부분적으로 상동성인 레지던트(resident) 플라스미드를 옮기는 컴피턴트 세포에 의한 도너(donor) 플라스미드의 흡수(uptake)를 수반하는 플라스미드 마커 레스큐(plasmid marker rescue) 형질전환과 같은 방법을 포함한다 (문헌[Contente *et al.*, Plasmid 2:555-571 [1979]]; 문헌[Haima *et al.*, Mol. Gen. Genet. 223:185-191 [1990]]; 문헌[Weinrauch *et al.*, J. Bacteriol. 154:1077-1087 [1983]]; 및 문헌[Weinrauch *et al.*, J. Bacteriol. 169:1205-1211 [1987]] 참조). 이러한 방법에서, 인커밍 도너 플라스미드는, 염색체 형질전환을 모방하는 프로세스에서 레지던트 "헬퍼(helper)" 플라스미드의 상동성 영역과 재조합된다.

[0213] 일반적으로 사용되는 방법에 더하여, 일부 실시 형태에서, 숙주 세포는 본 발명의 변이체 프로테아제를 암호화하는 핵산을 포함하는 DNA 작제물 또는 벡터에 의해 직접 형질전환된다 (즉, 숙주 세포 내로의 도입 전에 DNA 작제물 또는 벡터를 중폭하거나, 달리 처리하기 위해 중간체 세포가 사용되지 않는다). 본 발명의 DNA 작제물 또는 벡터의 숙주 세포 내로의 도입은 플라스미드 또는 벡터 내로의 삽입 없이 핵산 서열 (예를 들어, DNA 서열)을 숙주 세포 내로 도입하기 위한 본 기술 분야에 공지된 그러한 물리적 및 화학적 방법을 포함한다. 그러한 방법은 염화칼슘 침전, 전기천공, 네이키드(naked) DNA, 리포좀 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 추가적인 실시 형태에서, DNA 작제물 또는 벡터는 플라스미드 내로 삽입되지 않고 플라스미드와 공동-형질전환된다. 추가의 실시 형태에서, 선택 마커는, 본 기술 분야에 공지된 방법에 의해, 변경된 바실러스 균주로부터 결실된다 (문헌[Stahl *et al.*, J. Bacteriol. 158:411-418 [1984]]; 및 문헌[Palmeros *et al.*, Gene 247:255-264 [2000]] 참조).

[0214] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 형질전환된 세포는 종래의 영양 배지에서 배양된다. 적합한 특정 배양 조건, 예를 들어, 온도, pH 등은 당업자에게 공지되어 있고 과학 문헌에 잘 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, 본 발명은 본 발명의 적어도 하나의 변이체 프로테아제 또는 적어도 하나의 핵산을 포함하는 배양물 (예를 들어,

세포 배양물)을 제공한다. 또한 본 발명의 적어도 하나의 핵산, 백터, 또는 DNA 작제물을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0215] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 적어도 하나의 변이체 프로테아제를 암호화하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 형질전환된 숙주 세포는 본 발명의 프로테아제의 발현을 허용하는 조건 하에서 적합한 영양 배지에서 배양되고, 그 후에, 생성된 프로테아제는 배양물로부터 회수된다. 세포를 배양하는데 사용되는 배지는 숙주 세포를 성장시키기에 적합한 임의의 종래 배지, 예를 들어, 적절한 보충물을 함유하는 복합 배지 또는 최소 배지를 포함한다. 적합한 배지는 상업적 공급자로부터 입수 가능하거나 또는 공개된 레시피에 따라 준비될 수 있다 (예를 들어, 문헌[the catalogues of the American Type Culture Collection] 참조). 일부 실시 형태에서, 세포에 의해 생산된 프로테아제는, 예를 들어, 원심분리 또는 여과에 의해 배지로부터 숙주 세포를 분리하는 절차, 염 (예를 들어, 황산암모늄)에 의해 상정액 또는 여과물의 단백질성 성분을 침전시키는 절차, 크로마토그래피 정제 (예를 들어, 이온 교환, 젤 여과, 친화성 등)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 종래의 절차에 의해 배양 배지로부터 회수된다. 변이체 프로테아제를 회수하거나 정제하기에 적합한 임의의 방법이 본 발명에서 사용된다.

[0216] 일부 실시 형태에서, 재조합 숙주 세포에 의해 생산되는 변이체 프로테아제는 배양 배지 내로 분비된다. 정제 가능 도메인(purification facilitating domain)을 암호화하는 핵산 서열이 용해성 단백질의 정제를 가능하게 하는 테에 사용될 수 있다. 변이체 프로테아제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 백터 또는 DNA 작제물은 변이체 프로테아제의 정제를 가능하게 하기 위해 정제 가능 도메인을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함할 수 있다 (예를 들어, 문헌[Kroll *et al.*, DNA Cell Biol. 12:441-53 [1993]] 참조). 그러한 정제 가능 도메인에는, 예를 들어, 고정된 금속 상에서의 정제를 가능하게 하는 히스티딘-트립토판 모듈과 같은 금속 키링 웨이팅 웨이팅(문헌[Porath, Protein Expr. Purif. 3:263-281 [1992]] 참조), 고정된 면역글로불린 상에서의 정제를 가능하게 하는 단백질 A 도메인, 및 FLAGS 연장(extension)/친화성 정제 시스템에서 사용되는 도메인 (예를 들어, 미국 위성면주 시애틀 소재의 이뮤넥스 코포레이션(Immunex Corp.)으로부터 입수 가능한 단백질 A 도메인)이 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 정제 도메인과 이종 단백질 사이의 절단 가능한 링커(linker) 서열의 함유물(inclusion), 예를 들어 인자(Factor) XA 또는 엔테로키나제(enterokinase)(예를 들어, 미국 캘리포니아 주 샌디에고 소재의 인비트로젠(Invitrogen)으로부터 입수 가능한 서열)가 또한 정제를 가능하게 하는 데에 사용된다.

[0217] 본 발명의 변이체 프로테아제와 같은 효소의 효소 활성을 검출하고 측정하는 검정법이 공지되어 있다. 프로테아제 (예를 들어, 본 발명의 변이체 프로테아제)의 활성을 검출하고 측정하기 위한 다양한 검정법이 또한 당업자에게 공지되어 있다. 특히, 280 nm에서의 흡광도로서 측정되거나 또는 당업자에게 공지된 폴린(Folin) 방법을 사용하여 비색계에 의해 측정되는, 카세인 또는 헤모글로빈으로부터의 산-용해성 웨이팅의 방출에 기초한 검정법이 프로테아제 활성을 측정하는 데 이용 가능하다. 다른 예시적인 검정법은 색소생산성 기질(chromogenic substrate)의 가용화를 수반한다 (예를 들어, 문헌[Ward, "Proteinases," in Fogarty (ed.), *Microbial Enzymes and Biotechnology*, Applied Science, London, [1983], pp. 251-317] 참조). 다른 예시적인 검정법에는 석시닐-Ala-Ala-Pro-Phe-파라 니트로아닐리드 검정법 (suc-AAPP-pNA) 및 2,4,6-트라이니트로벤젠 설포네이트 소듐 염 검정법 (TNBS 검정법)이 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 당업자에게 공지된 수많은 추가적인 참고 문헌이 적합한 방법을 제공한다 (예를 들어, 문헌[Wellis *et al.*, Nucleic Acids Res. 11:7911-7925 [1983]]; 문헌[Christianson *et al.*, Anal. Biochem. 223:119-129 [1994]]; 및 문헌[Hsia *et al.*, Anal Biochem. 242:221-227 [1999]] 참조).

[0218] 다양한 방법이 숙주 세포에서의 성숙 프로테아제 (예를 들어, 본 발명의 성숙 변이체 프로테아제)의 생산 수준을 결정하는 데 사용될 수 있다. 그러한 방법에는, 예를 들어, 프로테아제에 특이적인 다중클론성 또는 단일클론성 항체 중 어느 하나를 사용하는 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 예시적인 방법에는 효소 결합 면역흡착 분석법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 방사면역검정법(radioimmunoassay, RIA), 형광 면역검정법(fluorescent immunoassay, FIA), 및 형광 활성화 세포 분리법(fluorescent activated cell sorting, FACS)이 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 이들 및 다른 검정법이 본 기술 분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌[Maddox *et al.*, J. Exp. Med. 158:1211 [1983]] 참조).

[0219] 일부 다른 실시 형태에서, 본 발명은 본 발명의 성숙 변이체 프로테아제를 제조하거나 생산하는 방법을 제공한다. 성숙 변이체 프로테아제는 신호 웨이팅 서열 또는 프로웨이팅 서열을 포함하지 않는다. 일부 방법은, 예를 들어, 바실러스 종 세포 (예를 들어, B. 서브틸리스 세포)와 같은 재조합 박테리아 숙주 세포에서 본 발명의 변이체 프로테아제를 제조하거나 생산하는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명은 본 발명의 변이체

프로테아제를 생산하는 방법을 제공하는데, 본 방법은 변이체 프로테아제의 생산에 도움이 되는 조건 하에서 본 발명의 변이체 프로테아제를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터를 포함하는 재조합 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 그러한 방법은 배양물로부터 변이체 프로테아제를 회수하는 단계를 추가로 포함한다.

[0220] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 본 발명의 변이체 프로테아제를 생산하는 방법을 제공하는데, 본 방법은: (a) 본 발명의 변이체 프로테아제를 암호화하는 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터를 세포 (예를 들어, B. 서브틸리스 세포와 같은 박테리아 세포)의 개체군 내로 도입하는 단계; 및 (b) 발현 벡터에 의해 암호화된 변이체 프로테아제의 생산에 도움이 되는 조건 하에서 배양 배지에서 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 그러한 방법은: (c) 세포로부터 또는 배양 배지로부터 변이체 프로테아제를 단리하는 단계를 추가로 포함한다.

페브릭 및 가정용 케어 제품

[0222] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 프로테아제 변이체는, 부가 물질 및 프로테아제 변이체를 포함하는 조성물에 사용될 수 있으며, 이 조성물은 페브릭 및 가정용 케어 제품이다.

[0223] 일부 실시 형태에서, 적어도 하나의 써몰리신 변이체를 포함하는 페브릭 및 가정용 케어 제품 조성물은 (총 조성물 중량을 기준으로) 하기 성분들 중 하나 이상을 포함한다: 약 0.0005 중량% 내지 약 0.1 중량%, 약 0.001 중량% 내지 약 0.05 중량%, 또는 심지어 약 0.002 중량% 내지 약 0.03 중량%의 상기 써몰리신 프로테아제 변이체; 및 하기 중 하나 이상: 약 0.00003 중량% 내지 약 0.1 중량%의 페브릭 색조 부여제(fabric hueing agent); 약 0.001 중량% 내지 약 5 중량%의 향료 캡슐; 약 0.001 중량% 내지 약 1 중량%의 냉수 가용성 중백제; 약 0.00003 중량% 내지 약 0.1 중량%의 표백 촉매; 약 0.00003 중량% 내지 약 0.1 중량%의 제1 세척 리파제; 약 0.00003 중량% 내지 약 0.1 중량%의 박테리아성 세정 셀룰라제; 및/또는 약 0.05중량% 내지 약 20 중량%의 게르베(Guerbet) 비이온성 계면활성제.

[0224] 일부 실시 형태에서, 페브릭 및 가정용 케어 제품 조성물은 액체 세탁 세제 또는 식기 세척 세제이다.

[0225] 페브릭 및 가정용 케어 제품은 유체 또는 고체를 포함하는 임의의 적합한 형태로 제공되도록 의도된다. 페브릭 및 가정용 케어 제품은, 특히 액체 형태인 경우, 단위 투여량 파우치의 형태일 수 있고, 전형적으로 페브릭 및 가정용 케어 제품은 적어도 부분적으로, 또는 심지어 완전히, 수용성 파우치로 둘러싸인다. 추가적으로, 적어도 하나의 프로테아제 변이체를 포함하는 페브릭 및 가정용 케어 제품의 일부 실시 형태에서, 페브릭 및 가정용 케어 제품은 상기에 상세히 설명된 파라미터들 및/또는 특징들의 임의의 조합을 가질 수 있다.

세정 조성물

[0227] 달리 언급되지 않는다면, 본 명세서에서 제공되는 모든 성분 또는 조성물 수준은 그 성분 또는 조성물의 활성 수준에 대하여 정해지고, 구매 가능한 공급원에 존재할 수 있는 불순물, 예를 들어, 잔류 용매 또는 부산물은 배제된다. 효소 성분 중량은 총 활성 단백질을 기준으로 한다. 달리 표시되지 않는다면, 모든 백분율 및 비는 중량을 기준으로 계산된다. 달리 표시되지 않는다면, 모든 백분율 및 비는 총 조성물을 기준으로 계산된다. 예시된 세제 조성물에서, 효소 수준은 총 조성물의 중량에 대한 순수한 효소에 의해 표시되고, 달리 특정되지 않는다면, 세제 성분은 총 조성물의 중량을 기준으로 표시된다.

[0228] 본 명세서에 표시된 바와 같이, 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 계면활성제, 중강제, 표백제, 표백 활성제, 표백 촉매, 기타 효소, 효소 안정화 시스템, 킬레이트제, 광학 중백제, 방오 중합체(soil release polymer), 이염제(dye transfer agent), 분산제, 거품 억제제, 염료, 향료, 착색제, 충전제 염, 하이드로트롭(hydrotrope), 광활성제, 형광 물질, 페브릭 컨디셔너, 가수분해성 계면활성제, 냉부제, 산화방지제, 수축방지제, 주름방지제, 살균제, 살진균제, 컬러 스펙클(color speckle), 실버케어(silvercare), 변색방지제 및/또는 부식방지제, 알칼리성 공급원, 가용화제, 담체, 가공 보조제(processing aid), 안료, 및 pH 조절제를 포함하지만 이에 한정되지 않는 부가 물질을 추가로 포함한다 (예를 들어, 모두가 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 제6,610,642호, 제6,605,458호, 제5,705,464호, 제5,710,115호, 제5,698,504호, 제5,695,679호, 제5,686,014호, 및 제5,646,101호 참조). 특정 세정 조성 물질의 실시 형태가 하기에 상세히 예시된다. 세정 부가 물질이 세정 조성물 중에서 본 발명의 변이체 프로테아제와 상용성이지 않은 실시 형태에서는, 이어서 세정 부가 물질 및 프로테아제(들)를, 두 성분의 조합이 적절해질 때까지 분리된 채로 (즉, 서로 접촉되지 않는 채로) 유지하는 적합한 방법이 사용된다. 그러한 분리 방법은 본 기술 분야에 공지된 임의의 적합한 방법(예를 들어, 젤캡(gelcap), 캡슐화, 정제(tablet), 물리적 분리 등)을 포함한다.

[0229] 본 발명의 세정 조성물은, 예를 들어, 세탁 용용, 경질 표면 세정, 식기세척 용용뿐만 아니라, 의치, 치아, 모

발 및 피부와 같은 미용 응용에 유리하게 이용된다. 추가로, 저온 용액에서의 증가된 효과라는 독특한 이점으로 인해, 본 발명의 효소는 세탁 응용에 이상적으로 적합하다. 나아가, 본 발명의 효소는 과립 및 액체 조성물에 사용된다.

[0230] 본 발명의 변이체 프로테아제는 또한 세정 첨가제 제품에 사용된다. 일부 실시 형태에서, 저온 용액 세정 응용이 사용된다. 일부 실시 형태에서, 본 발명은 본 발명의 적어도 하나의 효소를 포함하는 세정 첨가제 제품을 제공하고, 이는 추가적인 표백 효과가 요구되는 경우 세척 프로세스에 포함시키기에 이상적으로 적합하다. 그러한 예에는 저온 용액 세정 응용이 포함되지만 이에 한정되지는 않는다. 일부 실시 형태에서, 첨가제 제품은 그의 가장 단순한 형태에서, 하나 이상의 프로테아제이다. 일부 실시 형태에서, 첨가제는 세정 프로세스에 대한 첨가를 위한 투여량 형태로 포장된다. 일부 실시 형태에서, 첨가제는 과산소(peroxyxygen)의 공급원이 이용되고 증가된 표백 효과가 요구되는 세정 프로세스에 대한 첨가를 위한 투여량 형태로 포장된다. 환, 정제, 젤캡 또는 미리 측정된 분말 또는 액체와 같은 기타 단일 투여량 단위를 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 적합한 단일 투여량 단위 형태가 본 발명과 함께 사용된다. 일부 실시 형태에서, 그러한 조성물의 부피를 증가시키기 위해 충전제(들) 또는 담체 물질(들)이 포함된다. 적합한 충전제 또는 담체 물질은 설페이트, 카르보네이트 및 실리케이트의 다양한 염뿐만 아니라 탈크, 점토 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 적합한 액체 조성물용 충전제 또는 담체 물질은 물, 또는 폴리올 및 다이올을 포함하는 저분자량의 1차 및 2차 알코올을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 그러한 알코올의 예에는 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 아이소프로판올이 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 약 5% 내지 약 90%의 그러한 물질을 함유한다. pH를 감소시키기 위해 산성 충전제가 사용된다. 대안적으로, 일부 실시 형태에서, 세정 첨가제는, 하기에 더욱 충분하게 설명되는 것과 같은, 부가 성분들을 포함한다.

[0231] 본 발명의 세정 조성물 및 세정 첨가제는, 본 명세서에 제공된 프로테아제 변이체들 중 적어도 하나의 유효량을, 단독으로 또는 다른 프로테아제 및/또는 추가 효소와의 조합으로 필요로 한다. 효소의 필요한 수준은 본 발명의 프로테아제 변이체의 하나 이상의 첨가에 의해 달성된다. 전형적으로, 본 발명의 세정 조성물은 본 발명의 변이체 프로테아제들 중 적어도 하나를 약 0.0001 중량% 이상, 약 0.0001 내지 약 10, 약 0.001 내지 약 1, 또는 심지어 약 0.01 내지 약 0.1 중량%로 포함한다.

[0232] 본 명세서에서 세정 조성물은, 전형적으로 수성 세정 작업에서의 사용 동안, 세척수가 약 5.0 내지 약 11.5 또는 심지어 약 7.5 내지 약 10.5의 pH를 갖도록 제형화된다. 액체 제품 제형들은 전형적으로 순 pH가 약 3.0 내지 약 9.0 또는 심지어 약 3 내지 약 5가 되도록 제형화된다. 과립 세탁 제품은 전형적으로 pH 약 9 내지 약 11을 갖도록 제형화된다. 추천되는 사용 수준에서의 pH 조절 기술은 완충제, 알칼리, 산 등의 사용을 포함하며, 당업자에게 공지되어 있다.

[0233] 적합한 "낮은 pH 세정 조성물"은 전형적으로 순 pH가 약 3 내지 약 5이고, 전형적으로 그러한 pH 환경에서 가수 분해되는 계면활성제가 전형적으로 없다. 그러한 계면활성제는 적어도 하나의 에틸렌 옥사이드 부분 또는 심지어 약 1 내지 약 16 몰의 에틸렌 옥사이드를 포함하는 소듐 알킬 설페이트 계면활성제를 포함한다. 그러한 세정 조성물은 전형적으로 수산화나트륨, 모노에탄올아민 또는 염산과 같은 pH 조절제의 충분한 양을 포함하여, 순 pH가 약 3 내지 약 5인 그러한 세정 조성물을 제공한다. 그러한 조성물은 전형적으로 적어도 하나의 산 안정성 효소를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 액체인 반면, 다른 실시 형태에서는 고체이다. 그러한 액체 조성물의 pH는 전형적으로 순 pH로서 측정된다. 그러한 고체 조성물의 pH는 상기 조성물의 10% 고형물 용액으로서 측정되는데, 이때 용매는 중류수이다. 달리 표시되지 않는다면, 이러한 실시 형태들에서, 모든 pH 측정은 20°C에서 행해진다.

[0234] 일부 실시 형태에서, 변이체 프로테아제(들)가 과립 조성물 또는 액체 중에서 이용될 때, 저장 동안 과립 조성물의 다른 성분들로부터 변이체 프로테아제를 보호하기 위해 변이체 프로테아제는 캡슐화된 입자의 형태인 것이 바람직하다. 추가적으로, 캡슐화는 또한 세정 프로세스 동안 변이체 프로테아제의 이용가능성을 제어하는 수단이다. 일부 실시 형태에서, 캡슐화는 변이체 프로테아제(들) 및/또는 추가 효소들의 성능을 향상시킨다. 이와 관련하여, 본 발명의 변이체 프로테아제는 본 기술 분야에 공지된 임의의 적합한 캡슐화 재료로 캡슐화된다. 일부 실시 형태에서, 캡슐화 재료는 전형적으로 본 발명의 변이체 프로테아제(들)에 대한 촉매의 적어도 일부를 캡슐화한다. 전형적으로, 캡슐화 재료는 수용성 및/또는 수분산성이다. 일부 실시 형태에서, 캡슐화 재료는 0°C 이상의 유리 전이 온도(Tg)를 갖는다. 유리 전이 온도는 국제특허 공개 WO 97/11151호에 더욱 상세히 기재되어 있다. 캡슐화 재료는 전형적으로 탄수화물, 천연 또는 합성 검(gum), 키틴, 키토산, 셀룰로오스 및 셀룰로오스 유도체, 실리케이트, 포스페이트, 보레이트, 폴리비닐 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 파라핀 액스, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 캡슐화 재료가 탄수화물인 경우, 이는 전형적으로 단당류, 올리

고당류, 다당류, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 일부 전형적인 실시 형태에서, 캡슐화 재료는 전분이다 (예를 들어, 유럽 특허 EP 0 922 499호; 미국 특허 제4,977,252호; 미국 특허 제5,354,559호, 및 미국 특허 제5,935,826호 참조). 일부 실시 형태에서, 캡슐화 재료는 열가소성 물질, 아크릴로니트릴, 메타크릴로니트릴, 폴리아크릴로니트릴, 폴리메타크릴로니트릴 및 이들의 혼합물과 같은 플라스틱으로 제조된 미소구체 (microsphere)이고; 사용되는 구매가능한 미소구체는 익스판셀(EXPANCER)®(스웨덴 소재의 스톡비스베르肯(Stockviksverken)), 및 PM 6545, PM 6550, PM 7220, PM 7228, 익스텐도스피어스(EXTENDOSPHERES)®, 럭스실(LUXSIL)®, 큐-셀(Q-CEL)®, 및 스페리셀(SPERICEL)®(미국 펜실베니아주 밸리 포지 소재의 피큐 코포레이션(PQ Corp.))로 공급되는 것들을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0235] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 본 발명의 변이체 프로테아제는 세탁 세제 및 식기 세제를 포함하지만 이에 한정되지 않는 세정 산업에 특히 사용된다. 이들 응용은 효소를 다양한 환경적 스트레스 하에 둔다. 본 발명의 변이체 프로테아제는, 다양한 조건 하에서의 그의 안정성 때문에, 현재 사용되는 많은 효소들에 비해 이점을 제공한다.

[0236] 실제로, 다양한 세제 제형, 세척수 부피, 세척수 온도, 및 세척 시간의 길이를 포함하여, 세척에 관련된 프로테아제가 노출되는 다양한 세척 조건들이 있다. 또한, 상이한 지리학적 지역에서 사용되는 세제 제형은 세척수에 존재하는 그의 관련 성분의 농도가 상이하다. 예를 들어, 유럽의 세제는 세척수 중에 전형적으로 약 4500 내지 5000 ppm의 세제 성분을 갖는 반면, 일본의 세제는 세척수 중에 전형적으로 대략 667 ppm의 세제 성분을 갖는다. 북아메리카, 특히 미국에서, 세제는 세척수 중에 전형적으로 약 975 ppm의 세제 성분이 존재한다.

[0237] 저 세제 농도 시스템은 세척수 중에 약 800 ppm 미만의 세제 성분이 존재하는 세제를 포함한다. 일본의 세제는, 세척수 중에 대략 667 ppm의 세제 성분을 갖기 때문에, 전형적으로 저 세제 농도 시스템으로 간주된다.

[0238] 중 세제 농도는 세척수 중에 약 800 ppm 내지 약 2000 ppm의 세제 성분이 존재하는 세제를 포함한다. 북아메리카의 세제는, 세척수 중에 대략 975 ppm의 세제 성분이 존재하기 때문에, 일반적으로 중 세제 농도 시스템인 것으로 간주된다. 브라질에서는 전형적으로 세척수 중에 대략 1500 ppm의 세제 성분이 존재한다.

[0239] 고 세제 농도 시스템은 세척수 중에 약 2000 ppm 초과의 세제 성분이 존재하는 세제를 포함한다. 유럽의 세제는 세척수 중에 대략 4500 내지 5000 ppm의 세제 성분이 존재하기 때문에, 일반적으로 고 세제 농도 시스템인 것으로 간주된다.

[0240] 라틴 아메리카의 세제는 일반적으로 고 거품의 포스페이트 증강제 세제이고, 라틴 아메리카에서 사용되는 일련의 세제는, 세척수 중의 세제 성분이 1500 ppm 내지 6000 ppm 범위이기 때문에, 중 및 고 세제 농도 둘 모두에 속할 수 있다. 상기에 언급된 바와 같이, 브라질에서는 전형적으로 세척수 중에 대략 1500 ppm의 세제 성분이 존재한다. 그러나, 다른 라틴 아메리카 국가들에 제한되지 않는, 기타 고 거품의 포스페이트 증강제 세제 지역들은 세척수 중에 최대 약 6000 ppm의 세제 성분이 존재하는 고 세제 농도 시스템을 가질 수 있다.

[0241] 전술한 내용에 비추어, 전 세계적으로 전형적인 세척 용액 중의 세제 조성물의 농도는, 약 800 ppm 미만의 세제 조성물 ("저 세제 농도 지역"), 예를 들어 일본에서의 약 667 ppm로부터, 약 800 ppm 내지 약 2000 ppm ("중 세제 농도 지역"), 예를 들어 미국에서의 약 975 ppm 및 브라질에서의 약 1500 ppm으로, 그리고 약 2000 ppm 초과 ("고 세제 농도 지역"), 예를 들어 유럽에서의 약 4500 ppm 내지 약 5000 ppm 및 고 거품의 포스페이트 증강제 지역에서의 약 6000 ppm까지로 다양하다는 것이 분명하다.

[0242] 전형적인 세척 용액의 농도는 경험적으로 결정된다. 예를 들어, 미국에서, 전형적인 세탁기는 약 64.4 L 부피의 세척 용액을 수용한다. 따라서, 세척 용액 내에 약 975 ppm의 세제의 농도를 얻기 위해서는, 64.4 L의 세척 용액에 약 62.79 g의 세제 조성물첨가해야만 한다. 이러한 양은, 세제와 함께 제공되는 계량컵을 이용하여 소비자에 의해 세척수 내로 계량되어 넣어지는 전형적인 양이다.

[0243] 추가적인 예로서, 상이한 지역들에서는 상이한 세척 온도를 사용한다. 일본에서의 세척수의 온도는 전형적으로 유럽에서 사용되는 것보다 낮다. 예를 들어, 북아메리카 및 일본에서의 세척수의 온도는 전형적으로 약 10 내지 약 30°C (예를 들어, 약 20°C)인 반면, 유럽에서의 세척수의 온도는 전형적으로 약 30 내지 약 60°C (예를 들어, 약 40°C)이다. 그러나, 에너지를 절약하기 위하여, 많은 소비자들은 냉수 세척을 사용하는 것으로 바꾸고 있다. 또한, 일부 추가 지역에서, 냉수는 전형적으로 식기세척 응용뿐만 아니라 세탁을 위해서도 사용된다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 "냉수 세척"은 약 10°C 내지 약 40°C, 또는 약 20°C 내지 약 30°C, 또는 약 15°C 내지 약 25°C뿐만 아니라, 약 15°C 내지 약 35°C의 범위 내의 모든 다른 조합, 및 10°C 내지 40°C 내의 모든 범위의 온도에서의 세척에 적합한 "냉수 세제"를 사용한다.

[0244] 추가적인 예로서, 상이한 지역에서는 전형적으로 물의 경도가 상이하다. 물의 경도는 보통 혼합된 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 의, 갤런당 그레인(grain)으로 설명된다. 경도는 물 중의 칼슘 (Ca^{2+}) 및 마그네슘 (Mg^{2+})의 양의 척도이다. 미국에서 대부분의 물은 경수이나, 경도의 정도는 다양하다. 중경수(Moderately hard water)(60 내지 120 ppm) 내지 경수(121 내지 181 ppm)는 60 내지 181 ppm (백만분율)(백만분율을 U.S. 갤런당 그레인으로 환산하면, ppm #을 17.1로 나눈 것이 갤런당 그레인임)의 경질 광물을 갖는다.

물	갤런당 그레인	백만분율
연수	1.0 미만	17 미만
약경수	1.0 내지 3.5	17 내지 60
중경수	3.5 내지 7.0	60 내지 120
경수	7.0 내지 10.5	120 내지 180
고경수	10.5 초과	180 초과

[0245]

[0246] 유럽의 물의 경도는 전형적으로 갤런당 약 10.5 그레인 초과 (예를 들어 약 10.5 내지 약 20.0 그레인)의 혼합된 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (예를 들어, 갤런당 약 15 그레인의 혼합된 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$)이다. 북아메리카의 물의 경도는 전형적으로 일본의 물의 경도보다 높지만 유럽의 물의 경도보다는 낮다. 예를 들어, 북아메리카의 물의 경도는 약 3 내지 약 10 그레인, 약 3 내지 약 8 그레인 또는 약 6 그레인일 수 있다. 일본의 물의 경도는 전형적으로 북아메리카의 물의 경도보다 낮은데, 보통 갤런당 약 4 그레인 미만, 예를 들어 약 3 그레인의 혼합된 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 이다.

[0247] 따라서, 일부 실시 형태에서, 본 발명은 적어도 한 세트의 세척 조건 (예를 들어, 수온, 물의 경도, 및/또는 세제 농도)에서 놀라운 세척 성능을 나타내는 변이체 프로테아제를 제공한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 변이체 프로테아제는 세척 성능에 있어서 다른 써몰리신 프로테아제에 필적한다. 본 발명의 일부 실시 형태에서, 본 명세서에서 제공되는 변이체 프로테아제는 향상된 산화 안정성, 향상된 열안정성, 다양한 조건 하에서의 향상된 세정 능력 및/또는 향상된 퀄리티트 안정성을 나타낸다. 또한, 본 발명의 변이체 프로테아제는, 세제를 포함하지 않는 세정 조성물에, 역시 단독으로 또는 증강제 및 안정제와 조합하여 사용된다.

[0248] 본 발명의 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 조성물의 중량 기준으로 약 0.00001% 내지 약 10% 수준의 본 발명의 적어도 하나의 변이체 프로테아제, 및 조성물의 중량 기준으로 세정 부가 물질을 포함하는 나머지 (예를 들어, 약 99.999% 내지 약 90.0%)를 포함한다. 본 발명의 일부 다른 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 조성물의 중량 기준으로 약 0.0001% 내지 약 10%, 약 0.001% 내지 약 5%, 약 0.001% 내지 약 2%, 약 0.005% 내지 약 0.5% 수준의 적어도 하나의 변이체 프로테아제, 및 세정 부가 물질을 포함하는 세정 조성물의 나머지 (예를 들어, 약 99.9999% 내지 약 90.0%, 약 99.999% 내지 약 98%, 약 99.995% 내지 약 99.5%)를 포함한다.

[0249] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 세정 성능 및/또는 패브릭 캐어 및/또는 식기세척 이점들을 제공하는 하나 이상의 추가적인 세제 효소를 포함한다. 적합한 효소의 예에는, 헤미셀룰라제, 셀룰라제, 퍼옥시다제, 프로테아제, 자일라나제, 리파제, 포스포리파제, 에스테라제, 큐티나제, 페티나제, 펙테이트 리아제, 만나나제, 케라티나제, 리덕타제, 옥시다제, 페놀옥시다제, 리폭시게나제, 리그니나제, 풀루라나제, 탄나제, 펜토사나제, 말라나제, β -글루카나제, 아라비노시다제, 하이알루로니다제, 콘드로이티나제, 락카제, 및 아밀라제, 또는 이들의 임의의 조합 또는 혼합물을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 아밀라제와 함께 프로테아제, 리파제, 큐티나제 및/또는 셀룰라제와 같은 종래의 적용가능한 효소를 포함하는, 효소들의 조합 (즉, "칵테일")이 사용된다.

[0250] 본 명세서에서 제공되는 프로테아제 변이체 이외에, 임의의 다른 적합한 프로테아제가 본 발명의 조성물에 사용된다. 적합한 프로테아제는 동물, 식물 또는 미생물 기원의 것들을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 미생물 프로테아제가 사용된다. 일부 실시 형태에서, 화학적으로 또는 유전적으로 변형된 돌연변이들이 포함된다. 일부 실시 형태에서, 프로테아제는 세린 프로테아제, 바람직하게는 알칼리 미생물 프로테아제 또는 트립신-유사 프로테아제이다. 알칼리 프로테아제의 예에는 서브틸리신, 특히 바실러스로부터 유래된 것들 (예를 들어, 서브틸리신, 렌투스, 아밀로리퀴파시엔스, 서브틸리신 칼스버그(Carlsberg), 서브틸리신 309, 서브틸리신 147 및 서브틸리신 168)이 포함된다. 추가적인 예에는, 모두가 본 명세서에 참고로 포함되는 미국 특허 RE 34,606호, 제5,955,340호, 제5,700,676호, 제6,312,936호, 및 제6,482,628호에 기재된 돌연변이 프로테아제가 포함된다. 추가적인 프로테아제의 예에는 (예를 들어, 돼지 또는 소 기원의) 트립신, 및 국제특허 공개 WO 89/06270호에

기재된 푸사리움(*Fusarium*) 프로테아제가 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 본 발명에서 사용되는 구매가능한 프로테아제 효소에는 맥사타제(MAXATASE)®, 맥사칼(MAXACAL)™, 맥사펩(MAXAPEM)™, 옵티클린(OPTICLEAN)®, 옵티마제(OPTIMASE)®, 프로퍼라제(PROPEROSE)®, 퓨라펙트(PURAFFECT)®, 퓨라펙트® OXP, 퓨라맥스(PURAMAX)™, 엑셀라제(EXCELLASE)™, 및 퓨라페스트(PURAFAST)™(제넨코르(Generoncor)); 알칼라제(ALCALASE)®, 사비나제(SAVINASE)®, 프리마제(PRIMASE)®, 듀라짐(DURAZYM)™, 폴라자임(POLARZYME)®, 오보자임(OVOZYME)®, 칸나제(KANNASE)®, 리쿠아나제(LIQUANASE)®, 뉴트라제(NEUTRASE)®, 릴라제(RELASE)® 및 에스페라제(ESPERASE)®(노보자임스(Novozyymes)); 비랩(BLAP)™ 및 비랩™ 변이체(독일 뒤센도르프 소재의 헨켈콤만디트게젤샤프트 아우프 악티엔(Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien)), 및 캡(KAP)(B. 알칼로필루스서브틸리신; 일본 도쿄 소재의 카오 코포레이션(Kao Corp.))이 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 다양한 프로테아제가 국제특허 공개 WO95/23221호, WO 92/21760호, 미국 특허 출원 공개 제2008/0090747호, 및 미국 특허 제5,801,039호, 제5,340,735호, 제5,500,364호, 제5,855,625호, RE 34,606호, 제 5,955,340호, 제5,700,676호, 제6,312,936호, 및 제6,482,628호, 및 다양한 기타 특허에 기재되어 있다. 일부 추가의 실시 형태에서, 본 발명에서 사용되는 메탈로프로테아제는 국제특허 공개 WO 07/044993호에 기재된 중성 메탈로프로테아제를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0251] 또한, 임의의 적합한 리파제가 본 발명에 사용된다. 적합한 리파제는 박테리아 또는 진균 기원의 것들을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 화학적으로 또는 유전적으로 변형된 돌연변이가 본 발명에 포함된다. 유용한 리파제의 예에는 후미콜라 라누기노사(*Humicola lanuginosa*) 리파제 (예를 들어, 유럽 특허 EP 258 068호, 및 EP 305 216호 참조), 리조무코르 미하이(*Rhizomucor miehei*) 리파제 (예를 들어, 유럽 특허 EP 238 023호 참조), 칸디다(*Candida*) 리파제, 예를 들어 *C. 안타르크티카*(*C. antarctica*) 리파제 (예를 들어, *C. 안타르크티카* 리파제 A 또는 B; 예를 들어, 유럽 특허 EP 214 761호 참조), 슈도모나스 리파제, 예를 들어 *P. 알칼리게네스*(*P. alcaligenes*) 리파제 및 *P. 슈도알칼리게네스*(*P. pseudoalcaligenes*) 리파제 (예를 들어, 유럽 특허 EP 218 272호 참조), *P. 세파시아*(*P. cepacia*) 리파제 (예를 들어, 유럽 특허 EP 331 376호 참조), *P. 스투트제리*(*P. stutzeri*) 리파제 (예를 들어, 영국 특허 GB 1,372,034호 참조), *P. 플루오레센스*(*P. fluorescens*) 리파제, 바실러스 리파제 (예를 들어, *B. 서브틸리스* 리파제 [문헌[Dartois et al., Biochem. Biophys. Acta 1131:253-260 [1993]]]; *B. 스테아로씨모필루스* 리파제 [예를 들어, 일본 특허 JP 64/744992호 참조]; 및 *B. 푸밀러스*(*B. pumilus*) 리파제 [예를 들어, 국제특허 공개 WO 91/16422호])가 포함된다.

[0252] 더욱이, 페니실리움 카멤베르티(*Penicillium camembertii*) 리파제 (문헌[Yamaguchi et al., Gene 103:61-67 [1991]] 참조), 제오크리콤 칸디둠(*Geotrichum candidum*) 리파제 (문헌[Schimada et al., J. Biochem., 106:383-388 [1989]] 참조), 및 다양한 리조푸스(*Rhizopus*) 리파제, 예를 들어, *R. 델레마르*(*R. delemar*) 리파제 (문헌[Hass et al., Gene 109:117-113 [1991]] 참조), *R. 니베우스*(*R. niveus*) 리파제 (문헌[Kugimiya et al., Biosci. Biotech. Biochem. 56:716-719 [1992]]) 및 *R. 오리제*(*R. oryzae*) 리파제를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다수의 클로닝된 리파제가 본 발명의 일부 실시 형태에서 사용된다.

[0253] 슈도모나스 멘도시나(*Pseudomonas mendocina*)로부터 유래된 큐티나제 (국제특허 공개 WO 88/09367호 참조), 및 푸사리움 솔라니 피시(*Fusarium solani pisi*)로부터 유래된 큐티나제 (국제특허 공개 WO 90/09446호 참조)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 큐티나제와 같은 다른 유형의 씨몰리신 효소가 또한 본 발명의 일부 실시 형태에서 사용된다.

[0254] 추가의 적합한 리파제에는 구매가능한 리파제, 예를 들어, M1 리파제™, 루마 페스트(LUMA FAST)™, 및 리포맥스(LIPOMAX)™ (제넨코르); 리펙스(LIPEX)®, 리포라제(LIPOLASE)® 및 리포라제® 울트라(ULTRA) (노보자임스); 및 리파제 P™ "아마노(Amano)" (일본 소재의 아마노 파마슈티칼 컴퍼니 리미티드(Amano Pharmaceutical Co. Ltd.))가 포함된다.

[0255] 본 발명의 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 조성물의 중량 기준으로 약 0.00001% 내지 약 10%의 추가적인 리파제 수준의 리파제, 및 조성물의 중량 기준으로 나머지의 세정 부가 물질을 추가로 포함한다. 본 발명의 일부 다른 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 또한 조성물의 중량 기준으로 약 0.0001% 내지 약 10%, 약 0.001% 내지 약 5%, 약 0.001% 내지 약 2%, 약 0.005% 내지 약 0.5% 리파제의 수준으로 리파제를 포함한다.

[0256] 본 발명의 일부 실시 형태에서, 임의의 적합한 아밀라제가 본 발명에서 사용된다. 일부 실시 형태에서, 알카리성 용액에 사용되기에 적합한 임의의 아밀라제 (예를 들어, 알파 및/또는 베타 아밀라제)가 또한 사용된다. 적합한 아밀라제는 박테리아 또는 진균 기원의 것들을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서,

화학적으로 또는 유전적으로 변형된 돌연변이들이 포함된다. 본 발명에서 사용되는 아밀라제는 B. 리체니포르미스로부터 얻은 α-아밀라제 (예를 들어, 영국 특허 GB 1,296,839호 참조)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 본 발명에서 사용되는 구매가능한 아밀라제는 듀라밀(DURAMYL)®, 터마밀(TERMAMYL)®, 편자밀(FUNGAMYL)®, 스테인자임®®, 스테인자임 플러스(PLUS)®, 스테인자임 울트라(ULTRA)®, 및 벤(BAN)™(노보자임스)뿐만 아니라, 파워라제(POWERASE)™, 래피다제(RAPIDASE)® 및 맥사밀(MAXAMYL)® P(제넨코르)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0257] 본 발명의 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 조성물의 중량 기준으로 약 0.00001% 내지 약 10%의 추가적인 아밀라제의 수준의 아밀라제, 및 조성물의 중량 기준으로 나머지의 세정 부가 물질을 추가로 포함한다. 본 발명의 일부 다른 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 또한 조성물의 중량 기준으로 약 0.0001% 내지 약 10%, 약 0.001% 내지 약 5%, 약 0.001% 내지 약 2%, 약 0.005% 내지 약 0.5% 아밀라제의 수준으로 아밀라제를 포함한다.

[0258] 일부 추가의 실시 형태에서, 임의의 적합한 셀룰라제가 본 발명의 세정 조성물에 사용된다. 적합한 셀룰라제는 박테리아 또는 진균 기원의 것들을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 화학적으로 또는 유전적으로 변형된 돌연변이들이 포함된다. 적합한 셀룰라제는 후미콜라 인솔렌스(*Humicola insolens*) 셀룰라제 (예를 들어, 미국 특허 제4,435,307호 참조)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 특히 적합한 셀룰라제는 색상 케어 이점을 갖는 셀룰라제이다 (예를 들어, 유럽 특허 EP 0 495 257호 참조). 본 발명에서 사용되는 구매가능한 셀룰라제는 셀루자임(CELLUZYME)®, 케어자임(CAREZYME)®(노보자임스), 및 KAC-500(B)™(카오 코포레이션)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 셀룰라제는 성숙한 야생형 또는 변이체 셀룰라제의 일부분 또는 단편으로서 포함되는데, 이때 N-말단의 일부분이 결실된다(예를 들어, 미국 특허 제5,874,276호 참조). 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 조성물의 중량 기준으로 약 0.00001% 내지 약 10%의 추가적인 셀룰라제의 수준의 셀룰라제, 및 조성물의 중량 기준으로 나머지의 세정 부가 물질을 추가로 포함한다. 본 발명의 일부 다른 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 또한 조성물의 중량 기준으로 약 0.0001% 내지 약 10%, 약 0.001% 내지 약 5%, 약 0.001% 내지 약 2%, 약 0.005% 내지 약 0.5% 셀룰라제의 수준으로 셀룰라제를 포함한다.

[0259] 세제 조성물에 사용하기에 적합한 임의의 만나나제가 또한 본 발명에서 사용된다. 적합한 만나나제는 박테리아 또는 진균 기원의 것들을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 화학적으로 또는 유전적으로 변형된 돌연변이들이 포함된다. 본 발명에서 사용되는 다양한 만나나제들이 공지되어 있다 (예를 들어, 모두가 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 제6,566,114호, 미국 특허 제6,602,842호, 및 미국 특허 제6,440,991호 참조). 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 조성물의 중량 기준으로 약 0.00001% 내지 약 10%의 추가적인 만나나제의 수준의 만나나제, 및 조성물의 중량 기준으로 나머지의 세정 부가 물질을 추가로 포함한다. 본 발명의 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 또한 조성물의 중량 기준으로 약 0.0001% 내지 약 10%, 약 0.001% 내지 약 5%, 약 0.001% 내지 약 2%, 약 0.005% 내지 약 0.5% 만나나제의 수준으로 만나나제를 포함한다.

[0260] 일부 실시 형태에서, 퍼옥시다제가 본 발명의 조성물에서 과산화수소 또는 이의 공급원(예를 들어, 과탄산염, 과붕산염 또는 과황산염)과의 조합으로 사용된다. 일부 대안적인 실시 형태에서, 옥시다제는 산소와의 조합으로 사용된다. 두 유형의 효소들 모두는 "용액 표백"을 위해 (즉, 패브릭들이 세척액 중에서 함께 세척되는 경우, 염색된 패브릭으로부터 다른 패브릭으로 직물 염료(textile dye)가 이동하는 것을 방지하기 위하여), 바람직하게는 향상제(enhancing agent)와 함께 사용된다 (예를 들어, 국제특허 공개 WO 94/12621호 및 WO 95/01426호 참조). 적합한 퍼옥시다제/옥시다제는 식물, 박테리아 또는 진균 기원의 것들을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 화학적으로 또는 유전적으로 변형된 돌연변이들이 포함된다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 조성물의 중량 기준으로 약 0.00001% 내지 약 10%의 추가적인 퍼옥시다제 및/또는 옥시다제의 수준의 퍼옥시다제 및/또는 옥시다제 효소, 및 조성물의 중량 기준으로 나머지의 세정 부가 물질을 추가로 포함한다. 본 발명의 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 또한 조성물의 중량 기준으로 약 0.0001% 내지 약 10%, 약 0.001% 내지 약 5%, 약 0.001% 내지 약 2%, 약 0.005% 내지 약 0.5%의 퍼옥시다제 및/또는 옥시다제 효소의 수준으로 퍼옥시다제 및/또는 옥시다제 효소를 포함한다.

[0261] 일부 실시 형태에서, 퍼하이드롤라제 (예를 들어, 국제특허 공개 WO 05/056782호 참조)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 추가 효소가 사용된다. 또한, 일부 실시 형태에서, 상기에 언급된 효소들의 혼합물, 특히 하나 이상의 추가적인 프로테아제, 아밀라제, 리파제, 만나나제, 및/또는 적어도 하나의 셀룰라제가 본 명세서에 포함된다. 실제로, 이러한 효소들의 다양한 혼합물이 본 발명에서 사용될 것으로 고려된다. 다양한 수준의 변이체

프로테아제(들) 및 하나 이상의 추가 효소 둘 모두가 독립적으로 약 10%까지의 범위에 있고, 세정 조성물의 나머지는 세정 부가 물질일 수 있음이 또한 고려된다. 세정 부가 물질에 대한 구체적인 선택은 세정될 표면, 물 품 또는 페브릭, 및 사용 (예를 들어, 세척 세제 사용) 동안의 세정 조건들에 대해 요구되는 조성물의 형태를 고려하여 용이하게 이루어진다.

[0262] 적합한 세정 부가 물질의 예에는 계면활성제, 중강제, 표백제, 표백 활성제, 표백 촉매, 기타 효소, 효소 안정화 시스템, 퀼레이트제, 광학 증백제, 방오 중합체, 이염제, 이염 억제제, 촉매성 물질, 과산화수소, 과산화수소 공급원, 미리 형성된 과산, 중합체성 분산제, 점토 오염 제거제, 구조 탄성화제, 분산제, 거품 억제제, 염료, 향료, 착색제, 충전제 염, 하이드로트롭, 광활성제, 형광제, 페브릭 컨디셔너, 페브릭 유연제, 담체, 하이드로트롭, 가공 보조제, 용매, 안료, 가수분해성 계면활성제, 방부제, 산화방지제, 수축방지제, 주름방지제, 살균제, 살진균제, 컬러 스페클, 실버케어, 변색방지제 및/또는 부식방지제, 알칼리 공급원, 가용화제, 담체, 가공 보조제, 안료, 및 pH 조절제가 포함되지만 이에 한정되지 않는다(예를 들어, 모두가 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 제6,610,642호, 제6,605,458호, 제5,705,464호, 제5,710,115호, 제5,698,504호, 제5,695,679호, 제5,686,014호 및 제5,646,101호 참조). 특정 세정 조성 물질의 실시 형태가 하기에 상세히 예시된다. 세정 부가 물질이 세정 조성물 중에서 본 발명의 변이체 프로테아제와 상용성이지 않은 실시 형태에서는, 이어서 세정 부가 물질 및 프로테아제(들)를, 두 성분의 조합이 적절해질 때까지 분리된 채로 (즉, 서로 접촉되지 않는 채로) 유지하는 적합한 방법이 사용된다. 그러한 분리 방법은 본 기술 분야에 공지된 임의의 적합한 방법(예를 들어, 젤캡, 캡슐화, 정제, 물리적 분리 등)을 포함한다.

[0263] 일부 실시 형태에서, 단백질성 얼룩 제거를 필요로 하는 다양한 표면을 세정하는데 유용한 조성물에, 본 명세서에서 제공된 하나 이상의 변이체 프로테아제의 유효량이 포함된다. 그러한 세정 조성물은 경질 표면, 페브릭, 및 식기를 세정하는 것과 같은 응용을 위한 세정 조성물을 포함한다. 실제로, 일부 실시 형태에서, 본 발명은 페브릭 세정 조성물을 제공하는 한편, 다른 실시 형태에서, 본 발명은 비-페브릭 세정 조성물을 제공한다. 명백히, 본 발명은 (치분, 치약, 구강세척액 등뿐만 아니라 의치 세정 조성물을 포함하는) 구강 케어, 피부, 및 모발 세정 조성물을 포함하는, 개인 케어에 적합한 세정 조성물을 또한 제공한다. 본 발명이 임의의 형태 (즉, 액체, 과립, 바, 반-고체, 젤, 에멀젼, 정제, 캡슐 등)의 세제 조성물을 포함하도록 의도된다.

[0264] 일례로서, 본 발명의 변이체 프로테아제가 사용되는 몇몇 세정 조성물이 하기에 더욱 상세히 기재되어 있다. 본 발명의 세정 조성물이 세탁기 세척 방법(들)에 사용하기 적합한 조성물로서 제형화되는 일부 실시 형태에서, 본 발명의 조성물은 바람직하게는 적어도 하나의 계면활성제 및 적어도 하나의 중강제 화합물뿐만 아니라, 바람직하게는 유기 중합체 화합물, 표백제, 추가 효소, 거품 억제제, 분산제, 석회-비누(lime-soap) 분산제, 오염물 혼탁제 및 재침착방지제, 및 부식 억제제로부터 선택되는 하나 이상의 세정 부가 물질을 함유한다. 일부 실시 형태에서, 세탁 조성물은 또한 유연제를 (즉, 추가 세정 부가 물질로서) 함유한다. 본 발명의 조성물은 또한 고체 또는 액체 형태의 세제 첨가제 제품에 사용된다. 그러한 첨가제 제품은 종래의 세제 조성물의 성능을 보충 및/또는 상승시키도록 의도되며, 세정 프로세스 중 임의의 스테이지에서 첨가될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에서의 세탁 세제 조성물의 밀도는 20°C에서 측정된 조성물 중 약 400 내지 약 1200 g/리터의 범위인 한편, 다른 실시 형태에서는, 약 500 내지 약 950 g/리터의 범위이다.

[0265] 수동 식기세척 방법에 사용하기 위한 조성물로서 제형화되는 실시 형태에서, 본 발명의 조성물은 바람직하게는 적어도 하나의 계면활성제, 및 바람직하게는 유기 중합체 화합물, 거품 향상제, II족 금속 이온, 용매, 하이드로트롭 및 추가 효소로부터 선택되는 적어도 하나의 추가적인 세정 부가 물질을 함유한다.

[0266] 일부 실시 형태에서, 미국 특허 제6,605,458호에서 제공되는 것들과 같은 다양한 세정 조성물이 본 발명의 변이체 프로테아제와 함께 사용된다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 본 발명의 적어도 하나의 변이체 프로테아제를 포함하는 조성물은 콤팩트 과립 페브릭 세정 조성물인 한편, 다른 실시 형태에서, 조성물은 착색된 페브릭의 세탁에 유용한 과립 페브릭 세정 조성물이고, 추가의 실시 형태에서, 조성물은 세척 능력을 통해 유연화를 제공하는 과립 페브릭 세정 조성물이고, 추가적인 실시 형태에서, 조성물은 강력 액체 페브릭 세정 조성물이다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 적어도 하나의 변이체 프로테아제를 포함하는 조성물은 미국 특허 제6,610,642호 및 제6,376,450호에 기재된 것들과 같은 페브릭 세정 조성물이다. 또한, 본 발명의 변이체 프로테아제는 유럽 또는 일본의 세척 조건 하에서 특히 유용한 과립 세탁 세제 조성물에 사용된다 (예를 들어, 미국 특허 제6,610,642호 참조).

[0267] 일부 대안적인 실시 형태에서, 본 발명은 본 명세서에서 제공된 적어도 하나의 변이체 프로테아제를 포함하는 경질 표면 세정 조성물을 제공한다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 본 발명의 적어도 하나의 변이체 프로테아제

를 포함하는 조성물은 미국 특허 제6,610,642호, 제6,376,450호, 및 제6,376,450호에 기재된 것들과 같은 경질 표면 세정 조성물이다.

[0268] 더욱 추가의 실시 형태에서, 본 발명은 본 명세서에서 제공되는 적어도 하나의 변이체 프로테아제를 포함하는 식기세척 조성물을 제공한다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 본 발명의 적어도 하나의 변이체 프로테아제를 포함하는 조성물은 미국 특허 제6,610,642호 및 제6,376,450호에 기재된 것들과 같은 경질 표면 세정 조성물이다. 일부의 더욱 추가의 실시 형태에서, 본 발명은 본 명세서에서 제공되는 적어도 하나의 변이체 프로테아제를 포함하는 식기세척 조성물을 제공한다. 일부 추가 실시 형태에서, 본 발명의 적어도 하나의 변이체 프로테아제를 포함하는 조성물은 미국 특허 제6,376,450호 및 제6,376,450호에 기재된 것들과 같은 구강 케어 조성물을 포함한다. 전술한 미국 특허 제6,376,450호, 제6,605,458호, 제6,605,458호, 및 제6,610,642호에 포함된 화합물 및 세정 부가 물질의 제형 및 설명은 본 명세서에서 제공된 변이체 프로테아제와 함께 사용된다.

[0269] 본 발명의 세정 조성물은 임의의 적합한 형태로 제형화되고 조제자에 의해 선택되는 임의의 프로세스로 제조되는데, 이에 대한 비제한적인 예들이 미국 특허 제5,879,584호, 제5,691,297호, 제5,574,005호, 제5,569,645호, 제5,565,422호, 제5,516,448호, 제5,489,392호, 및 제5,486,303호에 기재되어 있으며, 이들 모두는 본 명세서에 참고로 포함된다. 낮은 pH 세정 조성물이 요구되는 경우, 그러한 조성물의 pH는 모노에탄올아민 또는 산성 물질, 예컨대 HCl과 같은 물질의 침가를 통해 조절된다.

[0270] 본 발명의 목적을 위해 필수적이지는 않지만, 이후 설명되는 부가물들의 비제한적인 목록은 본 세정 조성물에서 사용하기에 적합하다. 일부 실시 형태에서, 이러한 부가물들은, 예를 들어, 세정 성능의 보조 또는 향상을 위해, 세정되는 기재의 처리를 위해, 또는 향료, 착색제, 염료 등을 갖는 경우인 것과 같이 세정 조성물의 미감을 변경하기 위해 포함될 수 있다. 그러한 부가물들은 본 발명의 변이체 프로테아제 외의 것임이 이해된다. 이러한 추가 성분들의 정확한 속성, 및 이들의 포함 수준은 조성물의 물리적 형태 및 사용될 세정 작업의 속성에 의존할 것이다. 적합한 부가 물질은 계면활성제, 증강제, 퀼레이트제, 이염 억제제, 침착 보조제, 분산제, 추가 효소, 및 효소 안정제, 촉매성 물질, 표백 활성제, 표백 부스터, 과산화수소, 과산화수소 공급원, 미리 형성된 과산, 중합체성 분산제, 점토 오염 제거/재침착방지제, 증백제, 거품 억제제, 염료, 향료, 구조 탄성화제, 패브릭 유연제, 담체, 하이드로트륨, 가공 보조제 및/또는 안료를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 하기 설명에 더하여, 그러한 다른 부가물 및 사용 수준에 대한 적합한 예는 미국 특허 제5,576,282호, 제6,306,812호, 및 제6,326,348호에서 확인되며, 이들은 참고로 포함된다. 전술한 부가 성분은 본 발명의 세정 조성물의 나머지를 구성할 수 있다.

[0271] 일부 실시 형태에서, 본 발명에 따른 세정 조성물은 적어도 하나의 계면활성제 및/또는 계면활성제 시스템을 포함하며, 여기서 상기 계면활성제는 비이온성 계면활성제, 음이온성 계면활성제, 양이온성 계면활성제, 양성 계면활성제, 쯔비터이온성 계면활성제, 반-극성 비이온성 계면활성제 및 이들의 혼합물로부터 선택된다. 일부 낮은 pH 세정 조성물의 실시 형태(예를 들어, 순 pH가 약 3 내지 약 5인 조성물)에서, 조성물은 전형적으로 알킬 에톡실화 셀레이트를 함유하지 않는데, 이는 그러한 계면활성제가 그러한 조성물의 산성 함유물에 의해 가수분해될 수 있는 것으로 여겨지기 때문이다. 일부 실시 형태에서, 계면활성제는 세정 조성물의 중량 기준으로 약 0.1% 내지 약 60%의 수준으로 존재하는 한편, 대안적인 실시 형태에서, 그 수준은 약 1% 내지 약 50%, 더 추가의 실시 형태에서, 그 수준은 약 5% 내지 약 40%이다.

[0272] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 하나 이상의 세제 증강제 또는 증강제 시스템을 포함한다. 적어도 하나의 증강제를 포함하는 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 세정 조성물의 중량 기준으로 약 1% 이상, 약 3% 내지 약 60% 또는 심지어 약 5% 내지 약 40%의 증강제를 포함한다. 증강제는 폴리포스포레이트의 알칼리 금속, 암모늄 및 알칸올암모늄 염, 알칼리 금속 실리케이트, 알칼리 토금속 및 알칼리 금속 카르보네이트, 알루미노실리케이트, 폴리카르복실레이트 화합물, 에테르 하이드록시폴리카르복실레이트, 말레산 무수물과 에틸렌 또는 비닐 메틸 에테르의 공중합체, 1, 3, 5-트라이하이드록시 벤젠-2, 4, 6-트라이설퐻산, 및 카르복시메틸옥시석신산, 폴리아세트산의 다양한 알칼리 금속, 암모늄 및 치환된 암모늄 염, 예컨대 에틸렌다이아민 테트라아세트산 및 니트릴로트라이아세트산뿐만 아니라, 폴리카르복실레이트, 예컨대 멜리트산, 석신산, 시트르산, 옥시다이석신산, 폴리말레산, 벤젠 1,3,5-트라이카르복실산, 카르복시메틸옥시석신산, 및 이들의 가용성 염을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 실제로, 임의의 적합한 증강제가 본 발명의 다양한 실시 형태에서 사용될 것으로 고려된다.

[0273] 일부 실시 형태에서, 증강제는 시트레이트 및 폴리포스페이트(예를 들어, 소듐 트라이폴리포스페이트 및 소듐 트라이폴리포스페이트 6수화물, 포타슘 트라이폴리포스페이트, 및 혼합된 소듐 및 포타슘 트라이폴리포스페이트

등)와 같은 수용성 경질 이온 착물 (예를 들어, 금속이온봉쇄(sequestering) 증강제)을 형성한다. 본 기술 분야에 공지된 것들(예를 들어, 유럽 특허 EP 2 100 949호 참조)을 포함하는, 임의의 적합한 증강제가 본 발명에서 사용될 것으로 고려된다.

[0274] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 적어도 하나의 퀼레이트제를 함유한다. 적합한 퀼레이트제에는 구리, 철 및/또는 망간 퀼레이트제 및 이들의 혼합물이 포함되지만 이에 한정되지 않는다. 적어도 하나의 퀼레이트제가 사용되는 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 대상 세정 조성물의 중량 기준으로 약 0.1% 내지 약 15% 또는 심지어 약 3.0% 내지 약 10%의 퀼레이트제를 포함한다.

[0275] 일부 더 추가의 실시 형태에서, 본 명세서에서 제공되는 세정 조성물은 적어도 하나의 침착 보조제를 함유한다. 적합한 침착 보조제에는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리카르복실레이트, 방오 중합체, 예컨대 폴리테레프탈산, 점토, 예컨대 카올리나이트, 몬트모로나이트, 아타풀자이트, 일라이트, 벤토나이트, 할로이사이트, 및 이들의 혼합물이 포함되지만 이에 한정되지 않는다.

[0276] 본 명세서에서 나타낸 바와 같이, 일부 실시 형태에서, 재침착방지제가 본 발명의 일부 실시 형태에서 사용된다. 일부 실시 형태에서, 비이온성 계면활성제가 사용된다. 예를 들어, 자동 식기세척 실시 형태에서, 비이온성 계면활성제는, 특히 시팅(sheeting)을 위해, 표면 변형의 목적으로 사용되어, 막 형성 및 얼룩 형성을 방지하고 광채를 개선한다. 이러한 비이온성 계면활성제는 또한 오염의 재침착을 방지하는 데 사용된다. 일부 실시 형태에서, 재침착방지제는 본 기술 분야에 공지된 바와 같은 비이온성 계면활성제이다 (예를 들어, 유럽 특허 EP 2 100 949호 참조).

[0277] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 하나 이상의 이염 억제제를 포함한다. 적합한 중합체 이염 억제제는 폴리비닐피롤리돈 중합체, 폴리아민 N-옥사이드 중합체, N-비닐피롤리돈 및 N-비닐이미다졸의 공중합체, 폴리비닐옥사졸리돈 및 폴리비닐이미다졸 또는 이들의 혼합물을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 적어도 하나의 이염 억제제가 사용되는 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 세정 조성물의 중량을 기준으로 약 0.0001% 내지 약 10%, 약 0.01% 내지 약 5%, 또는 심지어 약 0.1% 내지 약 3%를 포함한다.

[0278] 일부 실시 형태에서, 실리케이트가 본 발명의 조성물 내에 포함된다. 일부 그러한 실시 형태에서, 규산나트륨 (예를 들어, 소듐 다이실리케이트, 소듐 메타실리케이트, 및 결정성 필로실리케이트)이 사용된다. 일부 실시 형태에서, 실리케이트는 약 1% 내지 약 20%의 수준으로 존재한다. 일부 실시 형태에서, 실리케이트는 조성물의 중량 기준으로 약 5% 내지 약 15%의 수준으로 존재한다.

[0279] 일부 또 다른 추가 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 또한 분산제를 함유한다. 적합한 수용성 유기 물질은, 폴리카르복실산이 2개 이하의 탄소 원자에 의해 서로 분리되는 2개 이상의 카르복실 라디칼을 포함하는, 단일중합체 또는 공중합체 산 또는 이의 염을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0280] 일부 추가의 실시 형태에서, 세정 조성물에 사용되는 효소는 임의의 적합한 기술에 의해 안정화된다. 일부 실시 형태에서, 본 발명에서 사용되는 효소는 칼슘 및/또는 마그네슘 이온을 효소에 제공하는 최종 조성물 내의 이러한 이온의 수용성 공급원의 존재에 의해 안정화된다. 일부 실시 형태에서, 효소 안정제는 올리고당류, 다당류, 및 칼슘 염과 같은 알칼리 토금속 염을 포함하는 무기 2가 금속 염을 포함한다. 효소 안정화를 위한 다양한 기술이 본 발명에서 사용될 것으로 고려된다. 예를 들어, 일부 실시 형태에서, 본 발명에서 사용되는 효소는 아연 (II), 칼슘 (II) 및/또는 마그네슘 (II) 이온뿐만 아니라 다른 금속 이온 (예를 들어, 바륨 (II), 스칸듐 (II), 철 (II), 망간 (II), 알루미늄 (III), 주석 (II), 코발트 (II), 구리 (II), 니켈 (II), 및 옥소바나듐 (IV))을 효소에 제공하는 최종 조성물 내의 이러한 이온의 수용성 공급원의 존재에 의해 안정화된다. 클로라이드 및 셀레이트가 또한 본 발명의 일부 실시 형태에서 사용된다. 적합한 올리고당류 및 다당류 (예를 들어, 텍스트린)의 예는 본 기술 분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 국제특허 공개 WO 07/145964호 참조). 일부 실시 형태에서, 가역적 프로테아제 억제제, 예를 들어 봉소-함유 화합물 (예를 들어, 봉산염, 4-포르밀 페닐 보론산)이 또한 사용되고/되거나, 필요한 경우, 안정성을 추가로 개선하기 위해 트라이펩티드 알데하이드가 사용된다.

[0281] 일부 실시 형태에서, 표백제, 표백 활성제 및/또는 표백 촉매가 본 발명의 조성물에 존재한다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 무기 및/또는 유기 표백 화합물(들)을 포함한다. 무기 표백제는 퍼하이드레이트 염 (예를 들어, 과봉산염, 과탄산염, 과인산염, 과황산염, 및 과규산염)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 무기 퍼하이드레이트 염은 알칼리 금속 염이다. 일부 실시 형태에서, 무기 퍼하이드레이트 염은 추가적인 보호 없이 결정성 고체로서 포함되지만, 일부 다른 실시 형태에서 염은 코팅된다.

본 기술 분야에 공지된 임의의 적합한 염이 본 발명에서 사용된다 (예를 들어, 유럽 특허 EP 2 100 949호 참조).

[0282] 일부 실시 형태에서, 표백 활성제가 본 발명의 조성물에 사용된다. 표백 활성제는 전형적으로 60°C 이하의 온도에서의 세정 프로세스에서 표백 작용을 증강시키는 유기 과산 친구체이다. 본 명세서에서 사용하기에 적합한 표백 활성제는, 과가수분해(perhydrolysis) 조건 하에서, 바람직하게는 약 1 내지 약 10 개의 탄소 원자, 특히 약 2 내지 약 4 개의 탄소 원자를 갖는 지방족 퍼옥시카르복실산, 및/또는 선택적으로 치환된 퍼벤조산을 제공하는 화합물을 포함한다. 추가적인 표백 활성제가 본 기술 분야에 공지되어 있고 본 발명에서 사용된다 (예를 들어, 유럽 특허 EP 2 100 949호 참조).

[0283] 또한, 일부 실시 형태에서 그리고 본 명세서에 추가로 기재된 바와 같이, 본 발명의 세정 조성물은 적어도 하나의 표백 촉매를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 코발트, 구리, 망간, 및 철 착물뿐만 아니라, 망간 트라이아자사이클로노난 및 관련 착물이 사용된다. 추가적인 표백 촉매가 본 발명에서 사용된다 (예를 들어, 미국 특허 제4,246,612호, 제5,227,084호, 제4,810410호, 국제특허 공개 WO 99/06521호, 및 유럽 특허 EP 2 100 949호 참조).

[0284] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 하나 이상의 촉매 금속 착물을 함유한다. 일부 실시 형태에서, 금속-합유 표백 촉매가 사용된다. 일부 실시 형태에서, 금속 표백 촉매는 정의된 표백 촉매 활성의 전이 금속 양이온 (예를 들어, 구리, 철, 티타늄, 루테늄, 텉스텐, 몰리브덴, 또는 망간 양이온), 표백 촉매 활성이 거의 없거나 전혀 없는 보조 금속 양이온 (예를 들어, 아연 또는 알루미늄 양이온), 및 촉매 및 보조 금속 양이온에 대해 정의된 안정성 상수를 갖는 금속이온봉쇄제 (특히 에틸렌다이아민테트라아세트산, 에틸렌다이아민테트라(메틸렌포스폰산) 및 이들의 수용성 염이 사용됨)를 포함하는 촉매 시스템을 포함한다 (예를 들어, 미국 특허 제4,430,243호 참조). 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 망간 화합물에 의해 촉매된다. 그러한 화합물 및 사용 수준은 본 기술 분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 제5,576,282호 참조). 추가 실시 형태에서, 코발트 표백 촉매가 본 발명의 세정 조성물에 사용된다. 다양한 코발트 표백 촉매가 본 기술 분야에 공지되어 있고 (예를 들어, 미국 특허 제5,597,936호 및 제5,595,967호 참조), 공지된 절차에 의해 용이하게 제조된다.

[0285] 일부 추가 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 마크로폴리사이클릭 강성 리간드(macropolyyclic rigid ligand (MRL))의 전이 금속 착물을 포함한다. 실제적인 문제로서, 그리고 제한적이지 않은 것으로서, 일부 실시 형태에서, 본 발명에 의해 제공되는 조성물 및 세정 프로세스는 수성 세척 매질 중에 적어도 1 ppm (part per hundred million) 정도의 활성 MRL 종을 제공하도록 조정되고, 일부 실시 형태에서, 세척액 중에 약 0.005 ppm 내지 약 25 ppm, 더욱 바람직하게는 약 0.05 ppm 내지 약 10 ppm, 및 가장 바람직하게는 약 0.1 ppm 내지 약 5 ppm의 MRL을 제공하도록 조정된다.

[0286] 일부 실시 형태에서, 이러한 전이-금속 표백 촉매 중의 전이-금속은 망간, 철 및 크롬을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. MRL은 또한 가교된 특정 초-강성 리간드 (예를 들어, 5,12-다이에틸-1,5,8,12-테트라아자바이사이클로[6.6.2]헥사데칸)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 적합한 전이 금속 MRL은 공지된 절차에 의해 용이하게 제조된다 (예를 들어, 국제특허 공개 WO 2000/32601호, 및 미국 특허 제6,225,464호 참조).

[0287] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 금속 보호제(metal care agent)를 포함한다. 금속 보호제는 알루미늄, 스테인레스 강, 및 비철 금속 (예를 들어, 은 및 구리)을 포함하는 금속들의 변색, 부식 및/또는 산화를 방지 및/또는 감소시키는데 사용된다. 적합한 금속 보호제에는 유럽 특허 EP 2 100 949호, 국제특허 공개 WO 9426860호 및 국제특허 공개 WO 94/26859호에 기재된 것들이 포함된다. 일부 실시 형태에서, 금속 보호제는 아연 염이다. 일부 추가 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 약 0.1 중량% 내지 약 5 중량%의 하나 이상의 금속 보호제를 포함한다.

[0288] 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 변이체 써몰리신 프로테아제를 갖는 고밀도 액체 (HDL) 조성물이다. HDL 액체 세탁 세제는 음이온성 세제성 계면활성제 (선형 또는 분지형 또는 랜덤 사슬, 치환 또는 비치환 알킬 세레페이트, 알킬 세포네이트, 알킬 알콕실화 세레페이트, 알킬 포스페이트, 알킬 포스포네이트, 알킬 카르복실레이트, 및/또는 이들의 혼합물의 군으로부터 선택됨)를 포함하는 세제성 계면활성제 (10% 내지 40%); 및 선택적으로 비이온성 계면활성제 (선형 또는 분지형 또는 랜덤 사슬, 치환 또는 비치환 알킬 알콕실화 알코올, 예를 들어 C₈-C₁₈ 알킬 에톡실화 알코올 및/또는 C₆-C₁₂ 알킬 폐놀 알콕실레이트의 군으로부터 선택됨)를 포함할 수 있으며, 선택적으로, (친수성 지수 (HIC)가 6.0 내지 9인) 음이온성 세제성 계면활성제 대 비이온성 세제성 계면활성제의

중량비는 1:1 초과이다.

[0289] 조성물은 선택적으로, 양친매성 알콕실화 그리스(grease) 세정 중합체 (0.05중량% 내지 10중량% 범위의 알콕실화 폴리알킬렌이민과 같은, 분지형 친수성 및 소수성 특성을 갖는 알콕실화 중합체의 군으로부터 선택됨), 및/ 또는 랜덤 그래프트 중합체 (전형적으로, 불포화 C₁-C₆ 카르복실산, 에테르, 알코올, 알데하이드, 케톤, 에스테르, 당 단위, 알콕시 단위, 말레산무수물, 포화 폴리알코올, 예를 들어 글리세롤, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 단량체를 포함하는 친수성 골격; 및 C₄-C₂₅ 알킬 기, 폴리프로필렌, 폴리부틸렌, 포화 C₁-C₆ 모노-카르복실산의 비닐 에스테르, 아크릴산 또는 메타크릴산의 C₁-C₆ 알킬 에스테르, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 소수성 측쇄(들)를 포함함)로 이루어진 계면활성 상승 중합체(surfactancy boosting polymer)를 포함할 수 있다.

[0290] 조성물은 추가적인 중합체, 예를 들어, 방오 중합체 (음이온성으로 말단-캡핑된 폴리에스테르, 예를 들어 SRP1, 랜덤 또는 블록 구성의, 당류, 다이카르복실산, 폴리올 및 이들의 조합으로부터 선택되는 적어도 하나의 단량체 단위를 포함하는 중합체, 랜덤 또는 블록 구성의 에틸렌 테레프탈레이트 중합체 및 이들의 공중합체, 예를 들어 Repel-o-tex SF, SF-2 및 SRP6, 텍스케어(Texcare) SRA100, SRA300, SRN100, SRN170, SRN240, SRN300 및 SRN325, 마르로퀘스트(Marloquest) SL을 포함함), 재침착방지 중합체 (0.1 중량% 내지 10중량%; 문자량이 500 내지 100,000 Da의 범위인, 카르복실레이트 중합체, 예를 들어, 아크릴산, 말레산 (또는 말레산 무수물), 푸마르산, 이타콘산, 아코니트산, 메사콘산, 시트라콘산, 메틸렌말론산, 및 이들의 임의의 혼합물로부터 선택되는 적어도 하나의 단량체를 포함하는 중합체, 비닐피롤리돈 단일중합체, 및/또는 폴리에틸렌 글리콜을 포함함); 셀룰로오스 중합체 (알킬 셀룰로오스, 알킬 알콕시알킬 셀룰로오스, 카르복시알킬 셀룰로오스, 알킬 카르복시알킬 셀룰로오스 (이의 예에는 카르복시메틸 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 메틸 하이드록시에틸 셀룰로오스, 메틸 카르복시메틸 셀룰로오스, 및 이들의 혼합물이 포함됨)로부터 선택되는 것들을 포함함) 및 중합체성 카르복실레이트 (예컨대 말레이트/아크릴레이트 랜덤 공중합체 또는 폴리아크릴레이트 단일중합체)를 포함할 수 있다.

[0291] 조성물은 포화 또는 불포화 지방산, 바람직하게는 포화 또는 불포화 C₁₂-C₂₄ 지방산 (0 중량% 내지 10 중량%); 침착 보조제 (이의 예에는 다당류, 바람직하게는 셀룰로오스 중합체, 폴리 다이알릴 다이메틸 암모늄 할라이드 (DADMAC), 및 랜덤 또는 블록 구성의, DAD MAC와 비닐 피롤리돈, 아크릴아미드, 이미다졸, 이미다졸리늄 할라이드, 및 이들의 혼합물과의 공중합체, 양이온성 구아 검, 양이온성 셀룰로오스, 예를 들어, 양이온성 하이드록시에틸 셀룰로오스, 양이온성 전분, 양이온성 폴리아실아미드, 및 이들의 혼합물이 포함됨)를 추가로 포함할 수 있다.

[0292] 조성물은 이염 억제제 (이의 예에는 망간 프탈로시아닌, 페옥시다제, 폴리비닐피롤리돈 중합체, 폴리아민 N-옥사이드 중합체, N-비닐피롤리돈과 N-비닐이미다졸의 공중합체, 폴리비닐옥사졸리돈 및 폴리비닐이미다졸 및/또는 이들의 혼합물이 포함됨); 퀼레이트제 (이의 예에는 에틸렌-다이아민-테트라아세트산 (EDTA); 다이에틸렌 트라이아민 펜타 메틸렌 포스폰산 (DTPMP); 하이드록시-에탄 다이포스폰산 (HEDP); 에틸렌다이아민 N,N'-다이석신산 (EDDS); 메틸 글리신 다이아세트산 (MGDA); 다이에틸렌 트라이아민 펜타 아세트산 (DTPA); 프로필렌 다이아민 테트라아세트산 (PDT A); 2-하이드록시피리딘-N-옥사이드 (HPNO); 또는 메틸 글리신 다이아세트산 (MGDA); 글루탐산 N,N-다이아세트산 (N,N-다이카르복시메틸 글루탐산 테트라소듐 염 (GLDA); 니트릴로트라이아세트산 (NTA); 4,5-다이하이드록시-m-벤젠다이설폰산; 시트르산 및 이의 임의의 염; N-하이드록시에틸에틸렌다이아민트라이-아세트산 (HEDTA), 트라이에틸렌테트라아민헥사아세트산 (TTHA), N-하이드록시에틸이미노다이아세트산 (HEIDA), 다이하이드록시에틸글리신 (DHEG), 에틸렌다이아민테트라프로피온산 (EDTP) 및 이들의 유도체가 포함됨)을 추가로 포함할 수 있다.

[0293] 조성물은, 프로테아제; 아밀라제; 리파제; 셀룰라제; 콜린 옥시다제; 페옥시다제/옥시다제; 펩테이트 리아제; 만나나제; 큐티나제; 락카제; 포스포리파제; 리소포스포리파제; 아실트랜스퍼라제; 페하이드롤라제; 아릴에스테라제 및 이들의 임의의 혼합물의 군으로부터 선택되는 효소 (0.01 중량%의 활성 효소 내지 0.03 중량%의 활성 효소)를 추가로 포함할 수 있다. 조성물은 효소 안정제 (이의 예에는 폴리올, 예를 들어, 프로필렌 글리콜 또는 글리세롤, 당 또는 당 알코올, 락트산, 가역적 프로테아제 억제제, 봉산, 또는 봉산 유도체, 예를 들어, 방향족 봉산염 에스테르, 또는 폐닐 보론산 유도체, 예를 들어, 4-포르밀페닐 보론산이 포함됨)를 포함할 수 있다.

[0294] 조성물은 실리콘 또는 지방산계 거품 억제제; 색조화 염료(hueing dye), 칼슘 및 마그네슘 양이온, 시각적 신호성분, 폼 방지제(anti-foam) (0.001 중량% 내지 약 4.0 중량%), 및/또는 구조화제/증점제 (0.01 중량% 내지 5

중량%; 다이클리세라이드 및 트라이클리세라이드, 에틸렌 글리콜 디스테아레이트, 미정질 셀룰로오스, 셀룰로오스계 물질, 미세섬유 셀룰로오스, 바이오플리머, 잔탄 겸, 젤란 겸, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택됨)를 추가로 포함할 수 있다.

[0295] 적합한 세제성 계면활성제에는 또한 양이온성 세제성 계면활성제 (알킬 피리디늄 화합물, 알킬 4차 암모늄 화합물, 알킬 4차 포스포늄 화합물, 알킬 3차 설포늄 화합물, 및/또는 이들의 혼합물의 군으로부터 선택됨); 쯔비터이온성 및/또는 양쪽성 세제성 계면활성제 (알칸올아민 설포-베타인의 군으로부터 선택됨); 양성 계면활성제; 반-극성 비이온성 계면활성제 및 이들의 혼합물이 포함된다.

[0296] 조성물은 임의의 액체 형태, 예를 들어, 액체 또는 젤 형태, 또는 임의의 이들의 조합일 수 있다. 조성물은 임의의 단위 투여량 형태, 예를 들어, 파우치일 수 있다.

[0297] 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 변이체 씨몰리신 프로테아제를 갖는 고 밀도 분말 (HDD) 조성물이다. HDD 분말 세탁 세제는, 음이온성 세제성 계면활성제 (선형 또는 분지형 또는 랜덤 사슬, 치환 또는 비치환 알킬 설페이트, 알킬 설포네이트, 알킬 알콕실화 설페이트, 알킬 포스페이트, 알킬 포스포네이트, 알킬 카르복실레이트 및/또는 이들의 혼합물의 군으로부터 선택됨), 비이온성 세제성 계면활성제 (선형 또는 분지형 또는 랜덤 사슬, 치환 또는 비치환 C₈-C₁₈ 알킬 에톡실레이트, 및/또는 C₆-C₁₂ 알킬 폐놀 알콕실레이트의 군으로부터 선택됨), 양이온성 세제성 계면활성제 (알킬 피리디늄 화합물, 알킬 4차 암모늄 화합물, 알킬 4차 포스포늄 화합물, 알킬 3차 설포늄 화합물, 및 이들의 혼합물의 군으로부터 선택됨), 쯔비터이온성 및/또는 양쪽성 세제성 계면활성제 (알칸올아민 설포-베타인의 군으로부터 선택됨); 양성 계면활성제; 반-극성 비이온성 계면활성제 및 이들의 혼합물을 포함하는 세제성 계면활성제; 증강제 (포스페이트 무함유 증강제 [예를 들어 제올라이트 증강제; 이의 예에는, 0 중량% 내지 10 중량% 미만의 범위의, 제올라이트 A, 제올라이트 X, 제올라이트 P 및 제올라이트 MAP가 포함됨]; 포스페이트 증강제 [이의 예에는 0 중량% 내지 10 중량% 미만의 범위의 소듐 트라이폴리포스페이트가 포함됨]; 15 중량% 미만의 범위의 시트르산, 시트레이트 염 및 니트릴로트라이아세트산 또는 이의 염); 실리케이트 (0중량% 내지 10 중량% 미만의 범위의 규산나트륨 또는 규산칼륨 또는 소듐 메타실리케이트, 또는 총상 실리케이트 (SKS-6)); 카르보네이트 염 (0 중량% 내지 10 중량% 미만의 범위의 탄산나트륨 및/또는 중탄산나트륨); 및 표백제 (광표백제 (이의 예에는 설폰화 아연 프탈로시아닌, 설폰화 알루미늄 프탈로시아닌, 잔렌 염료, 및 이들의 혼합물이 포함됨); 소수성 또는 친수성 표백 활성제 (이의 예에는 도데카노일 옥시벤젠 설포네이트, 테카노일 옥시벤젠 설포네이트, 테카노일 옥시벤조산 또는 이의 염, 3,5,5-트라이메틸 헥사노일 옥시벤젠 설포네이트, 테트라아세틸 에틸렌 다이아민-TAED, 및 노나노일옥시벤젠 설포네이트-NOBS, 니트릴 콰트, 및 이들의 혼합물이 포함됨); 과산화수소; 과산화수소 공급원 (무기 피하이드레이트 염; 이의 예에는 과붕산염, 과탄산염, 과황산염, 과인산염, 또는 과규산염의 모노 또는 테트라 하이드레이트 소듐 염이 포함됨); 미리 형성된 친수성 및/또는 소수성 과산 (피카르복실산 및 염, 과탄산 및 염, 페이미드산 및 염, 페옥시모노황산 및 염으로 이루어진 군으로부터 선택됨) 및 이들의 혼합물 및/또는 표백 촉매 (예를 들어, 이민 표백 부스터 (이의 예에는 이미늄 양이온 및 폴리이온; 이미늄 쯔비터이온; 변형된 아민; 변형된 아민 옥사이드; N-설포닐 이민; N-포스포닐 이민; N-아실 이민; 티아다이아졸 다이옥사이드; 퍼플루오로이민; 환형 당 케톤 및 이들의 혼합물이 포함됨); 금속-함유 표백 촉매, 예를 들어 구리, 철, 티타늄, 루테늄, 텅스텐, 몰리브덴, 또는 망간 양이온과 함께 보조 금속 양이온, 예를 들어, 아연 또는 알루미늄, 및 금속이온봉쇄제, 예를 들어, 에틸렌다이아민테트라아세트산, 에틸렌다이아민테트라(메틸렌포스폰산) 및 이들의 수용성 염)를 포함할 수 있다.

[0298] 조성물은 프로테아제; 아밀라제; 리파제; 셀룰라제; 콜린 옥시다제; 페옥시다제/옥시다제; 퀘테이트 리아제; 만나나제; 큐티나제; 락카제; 포스포리파제; 리소포스포리파제; 아실트랜스퍼라제; 퍼하이드롤라제; 아릴에스테라제 및 이들의 임의의 혼합물의 군으로부터 선택되는 효소를 추가로 포함할 수 있다.

[0299] 조성물은 향료 마이크로캡슐, 전분 캡슐화된 향료 어코드(accord), 색조부여제, 패브릭 완전성(fabric integrity)과 양이온성 중합체를 포함하는 추가적인 중합체, 다이 록(dye lock) 성분, 패브릭-유연제, 증백제 (예를 들어 C.I. 형광 증백제), 응집제(flocculating agent), 퀼레이트제, 알콕실화 폴리아민, 패브릭 침착 보조제, 및/또는 사이클로덱스트린을 포함하는 추가적인 세제 성분을 추가로 포함할 수 있다.

[0300] 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 변이체 씨몰리신 프로테아제를 갖는 자동 식기세척 (ADW) 세제 조성물이다. ADW 세제는, 0 내지 10 중량%의 양으로 존재하는, 에톡실화 비이온성 계면활성제, 알코올 알콕실화 계면활성제, 에폭시-캡핑된 폴리(옥시알킬화) 알코올, 또는 아민 옥사이드 계면활성제의 군으로부터 선택되는 둘 이상의 비이온성 계면활성제; 포스페이트 증강제 (모노-포스페이트, 다이-포스페이트, 트라이-폴리포스페이트 또는 올리고머성-폴리포스페이트, 바람직한 소듐 트라이폴리포스페이트-STPP) 또는 포스페이트-무함유 증강제 [아미노산

계 화합물 (이의 예에는 MGDA (메틸-글리신-다이아세트산) 및 이의 염 및 유도체, CLDA (글루타믹-N,N-다이아세트산) 및 이의 염 및 유도체, IDS (이미노다이석신산) 및 이의 염 및 유도체, 카르복시 메틸 이눌린 및 이의 염 및 유도체, 및 이들의 혼합물이 포함됨), 니트릴로트라이아세트산 (NTA), 다이에틸렌 트라이아민 펜타 아세트산 (DTPA), B-알라닌다이아세트산 (B-ADA) 및 이들의 염]을 포함하는 5 내지 60% 범위의 증강제, 폴리카르복실산 및 이들의 부분적으로 또는 완전히 중화된 염의 단일중합체 및 공중합체, 0.5 중량% 내지 50 중량% 범위의 단량체성 폴리카르복실산 및 하이드록시카르복실산 및 이들의 염; 약 0.1 중량% 내지 약 50 중량% 범위의 세포화/카르복실화 중합체 (생성물에 치수 안정성을 제공함); 약 0.1 중량% 내지 약 10 중량% 범위의 건조 보조제 (폴리에스테르, 특히, 중축합에 도움이 되는 3 내지 6개의 작용기, 특히 산, 알코올 또는 에스테르 작용기를 갖는 추가의 단량체를 선택적으로 갖는 음이온성 폴리에스테르, 폴리카르보네이트-, 폴리우레탄- 및/또는 폴리우레아-폴리오르가노실록산 화합물, 또는 반응성 환형 카르보네이트 및 우레아 유형의 이의 전구 화합물로부터 선택됨); 약 1 중량% 내지 약 20 중량% 범위의 실리케이트 (규산나트륨 또는 규산칼륨, 예를 들어 소듐 다이실리케이트, 소듐 메타실리케이트, 및 결정성 필로실리케이트); 무기 표백제 (예를 들어 페하이드레이트 염, 예를 들어, 과붕산염, 과탄산염, 과인산염, 과황산염 및 과규산염) 및 유기 표백제 (예를 들어, 다이아실 및 테트라아실페옥사이드를 포함하는 유기 페옥시산, 특히 다이페옥시도데칸이산, 다이페옥시테트라데칸이산, 및 다이페옥시헥사데칸이산); 약 0.1 중량% 내지 약 10 중량% 범위의 표백 활성제 - 유기 과산 전구체; 표백 촉매 (망간 트라이아자사이클로노난 및 관련 착물, Co, Cu, Mn 및 Fe 비스페리딜아민 및 관련 착물, 및 펜타아민 아세테이트 코발트(III) 및 관련 착물로부터 선택됨); 약 0.1 중량% 내지 5 중량% 범위의 금속 보호제 (벤조트라이아졸, 금속 염 및 착물, 및/또는 실리케이트로부터 선택됨); 자동 식기세척 세제 조성물의 그램당 약 0.01 내지 5.0 mg의 활성 효소의 범위의 효소 (프로테아제; 아밀라제; 리파제; 셀룰라제; 콜린 옥시다제; 페옥시다제/옥시다제; 퀘테이트 리아제; 만나나제; 큐티나제; 락카제; 포스포리파제; 리소포스포리파제; 아실트랜스페라제; 페하이드롤라제; 아릴에스테라제 및 이들의 임의의 혼합물의 군으로부터 선택됨); 및 효소 안정제 성분 (올리고당류, 다당류 및 무기 2가 금속 염으로부터 선택됨)을 포함할 수 있다.

[0301] 하기 표는 본 발명의 변이체 씨몰리신 변이체를 갖는 조성물로서 유용한 대표적인 세제 조성물을 나타낸다.

HDL 세제 조성물	
성분	중량%
효소 (프로테아제 + 리파제 + 아밀라제)	3
선행 알킬 벤젠 세포화 (HLAS)	10
평균 에톡실화도가 9인 C12-14 알킬 에톡실화 알코올 (AE9)	2
평균 에톡실화도가 3인 C12-14 알킬 에톡실화 세포화 (HAES)	23
C16-17 알킬 중쇄(mid chain) 분지형 알킬 세포레이트	4
아민 옥사이드	1
C12-18 지방산	2
PE20 중합체	3
폴리에틸렌 이민 중합체	3
킬레이트제	1.4
FW A 15 중백제	0.4
p-글리콜 (용매)	8
DEG (용매)	0.5
에탄올	3
모노에탄올아민	6
물	26
NaOH	0.3
향료	1
실리콘 가품 억제제	0.06
바이올렛(Violet) DD 염료	0.01
기타 염료	0.03
수소화 피마자유 (구조화제/증점제)	0.1
운모	0.2
칼슘 포르메이트	0.1
소듐 포르메이트	0.2
기타	100 까지

[0302]

HDD 세제 조성물				
성분	조성물 A	조성물 B	조성물 C	조성물 D
효소 (리파제 + 기타 효소)	0.8 중량%	0.8 중량%	0.8 중량%	0.8 중량%
선행 알킬 벤젠 설포네이트	9 중량%	9 중량%	12 중량%	8 중량%
평균 에톡실화도가 0.5 내지 3 인 알킬 에톡실화 설페이트	3 중량%	2 중량%	1 중량%	2 중량%
양이온성 세제성 계면활성제	0.5 중량%	0.5 중량%	0.5 중량%	0.5 중량%
황산나트륨	55 중량%	55 중량%	55 중량%	55 중량%
탄산나트륨	8 중량%	10 중량%	5 중량%	8 중량%
글리세롤 카르보네이트	9 중량%	12 중량%	8 중량%	10 중량%
옥사지리디늄계 표백제 촉매	0.005 중량%	0.005 중량%	0.005 중량%	0.005 중량%
규산나트륨	3 중량%	0 중량%	3 중량%	0 중량%
카르복실레이트 중합체	2 중량%	2 중량%	2 중량%	2 중량%
증백제	0.02 중량%	0.02 중량%	0.02 중량%	0.02 중량%
셀룰로오스 중합체	0.3 중량%	0.3 중량%	0.3 중량%	0.3 중량%
기타 & 수분	100 중량%까지	100 중량%까지	100 중량%까지	100 중량%까지

[0303]

HDD 세제 조성물						
성분	1(중량%)	2(중량%)	3(중량%)	4(중량%)	5(중량%)	6(중량%)
평균 지방족 사슬 길이가 C11-12 인 소듐선행 알킬벤젠설포네이트	10.3	10.7	14	17	12.2	8.3
소듐 라우릴설페이트	0	3.5	0	1.4	1.2	0
소듐 C12-14 알코올 에톡시-3-설페이트	0	0	0.8	0	0	3
평균 7 폴의 에톡실화를 갖는 C13-15 옥소 알코올 에톡실레이트 (루텐솔(Lutensol)® A07)	1.57	0	0	0	1.2	0
평균 7 폴의 에톡실화를 갖는 C10- 게르메 (2-프로필헵坦-I-올) 알코올 에톡실레이트 (루텐솔® XPT0)	0	1.5	0	0	1.2	0
평균 7 폴의 에톡실화를 갖는 C16-18 알코올 에톡실레이트	0	0.5	0	0	0.3	0
평균 5 폴의 에톡실화를 갖는 C12-18 알코올 에톡실레이트	0	0.3	0	0	0	0
C12-14 알킬 하이드록시에틸 다이메틸 암모늄 클로라이드 (프레이파제® HY)	0	0	0.7	0.54	0.1	1
소듐 트라이폴리포스페이트	0	0	0.6	0	1	0
제올라이트 A (증강제)	2.7	3.4	0	0	0.5	1.6
시트르산	1.8	2	0	1.4	0	2
소듐 시트레이트	0	1.9	0	0	0	0
증탄산나트륨	29	35	36.7	34	53	22
세스퀴탄산나트륨 2 수화물	0	0	1.2	0	0	0
탄산나트륨	1.2	0	1.9	0	0	0
소듐 폴리아크릴레이트 (MW 4000, 소칼란(Sokalan) PA25 CL)	0	0	1	0	0	0
소듐 폴리아크릴레이트 (MW 8000, 소칼란 PA30 CL)	1.45	1.6	0	0.97	1	0
소듐 폴리아크릴레이트/말테이트 공중합체 MW 70,000, 70:30 비, 소칼란® CPS	0	0	0.3	0	0	3
폴리에틸렌 글리콜/비닐 아세테이트 랜덤 그래프트 공중합체	0	0	0.8	1	1	0
카르복시메틸 셀룰로오스 (핀픽스(Finfix)® GDA)	1	0.9	0	0	0	0
카르복시메틸 셀룰로오스(핀픽스® V)	0	0	0	0.3	1.1	0.92
소수성으로 개질된 카르복시메틸 셀룰로오스 (핀픽스® SH-I)	0	0	0.5	0	0	0
C.I. 영광 증백제 260	0.1	0.13	0.1	0.03	0.05	0.18
C.I. 영광 증백제 351 (티노팔(Tinopal)® CBS)	0	0.06	0.08	0	0	0
다이에틸렌트라이아민 펜타아세트산	0	0	0.2	0.1	0.2	0
네트라소듐 S,S-에틸렌다이아민 다이에틸시네이트	0	0	0	0.3	0	0.3
다이에틸렌트라이아민 펜타(메틸 포스포산), 헬타소듐 염	0	0.2	0	0	0	0
1-하이드록시에탄-1,1-다이포스포산	0.1	0.2	0.3	0	0.2	0.4
2-포스포노부坦 1,2,4- 트라이카르복실산 (베이히비트(Bayhibit)® AM)	0	0	0	0.4	0	0
MgSO4	0	0	0	0.8	0	0.4

[0304]

과탄산나트륨	9	12	7	6	8	9
프로필렌 글리콜 다이아세테이트	7	10	10.8	0	0	0
트라이에틸렌 글리콜 다이아세테이트	0	0	0	5	7	3.9
옥사지리디늄계 표백 부스터	0.03	0	0.03	0.02	0.05	0.02
프로테아제 1	4.3	3.3	6.3	5.7	3.3	0
프로테아제 2	0	0	0	0	0	2.2
아밀라제	2.2	1.51	1	2.2	1.9	3.3
리파제	0	0	3.6	0	0	2.7
엔도글루카나제 1	0	0	5.3	3.3	0	0
엔도글루카나제 2	2.1	1.3	0	0	0	2.4
만나나제	1.3	1.54	1.3	0	1.2	1.9
페하이드롤라제 1	2	0	1.8	0	2.1	1.9
페하이드롤라제 2	0	4.1	0	2.3	0	0
다이액트 바이올렛(Direct Violet) 9	0	0	0.0003	0.0004	0	0
솔벤트 바이올렛(Solvent Violet) 13	0	0	0.002	0	0	0
텍스케어® SRA300F	0.3	1.2	0	1	0.33	0.3
다이 록(Dye lock)	0.02	0.02	0	0	0	0
(티노릭스(Tinolux)® BMC)	0	0	0	0	0	0.0015
C.I. 푸드 레드(Food Red) 14	0	0	0.001	0	0	0.001
거품 억제제 과립	0.2	0.2	0	0	0.3	0
수분	7	6.3	8.9	9.1	4.3	4.6
향료	0.2	0.3	0.4	0.3	0.2	0.3
황산나트륨	100%까지 의 나머지					

자동 식기세척 (ADW) 세제 조성물				
제형	1	2	3	4
성분	수준 (중량%)	수준 (중량%)	수준 (중량%)	수준 (중량%)
고체 ADW 세제 조성물				
STPP	35	0	0	56
카르보네이트	24	45	40	18.5
메틸글리신 다이아세트산 (83% 활성)	0	15	20	0
실리케이트	7	7	7	1.5
TEAD (테트라아세틸에틸렌다이아민)	0.5	0.5	0.5	3.8
탄산아연	0.5	0.5	0.5	0
SLF18	1.5	1.5	1.5	0
플루라파(Plurafac) LF224				0.6
펩타 아민 아세테이트-코발트(III) 니트레이트 (1% 활성)	0.5	0.5	0.5	0.6
과탄산염	15	15	15	11
설휠화 종합체	10	4	3	5.1
아밀라제 (14.4mg/g 활성)	1.3	1.8	1.5	0.7
가공 보조제, 향료 및 황산나트륨	나머지	나머지	나머지	나머지
액체 자동 식기세척 세제 조성물				
다이프로필렌 글리콜	45	45	45	25
SLF18	45	45	45	0
네오돌(Neodol) 1-9	3	3	3	2.6
루덴솔 T07				30
플루라파 LF224				32.4
아민 옥사이드				3.6
글리세린	2	2	2	4
가공 보조제 및 염료	나머지	나머지	나머지	나머지
제 2 액체 자동 식기세척 세제 조성물 (3 구획 단위 투여량의 일부)				

[0305]

[0306]

화합물	HDL 세제 조성물				
	I	II	III	IV	V
LAS	24	32	6	3	6
NaC ₁₆ -C ₁₇ HSAS	-	-	-	5	-
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{1.5} S	-	-	8	7	5
C ₈ -C ₁₀ 프로필 다이메틸 아민	2	2	2	2	1
C ₁₂ -C ₁₄ 알킬 다이메틸 아민 옥사이드	-	-	-	-	2
C ₁₂ -C ₁₅ AS 알킬 설레이트	-	-	17	-	8
C12-C14 알킬 N-메틸 글루카미드 (CFAA) 계면활성제	-	5	4	4	3
C ₁₂ -C ₁₄ 지방 알코올 에톡실레이트	12	6	1	1	1
C ₁₂ -C ₁₈ 지방산	3	-	4	2	3
시트르산 (무수)	4.5	5	3	2	1
DETPMP	-	-	1	1	0.5
모노에탄올아민	5	5	5	5	2
수산화나트륨	-	-	2.5	1	1.5
1N HCl 수용액	#1	#1	-	-	-
프로판다이올	12.7	14.5	13.1	10	8
에탄올	1.8	2.4	4.7	5.4	1
DTPA	0.5	0.4	0.3	0.4	0.5
페틴 리아제	-	-	-	0.005	-
아밀라제	0.001	0.002	-	-	-
셀룰라제	-	-	0.0002	-	0.0001
리파제	0.1	-	0.1	-	0.1
메탈로프로테아제 1 (선택적)	0.05	0.3	-	0.5	0.2
메탈로프로테아제 2	-	-	0.08	-	-
프로테아제 A (선택적)	-	-	-	-	0.1
알도스 옥시다제	-	-	0.3	-	0.003
ZnCl ₂	0.1	0.05	0.05	0.05	0.02
Ca 포르메이트	0.05	0.07	0.05	0.06	0.07
DETBCHD	-	-	0.02	0.01	-
SRP1 (음이온성으로 말단 캡핑된 폴리에스테르)	0.5	0.5	-	0.3	0.3
봉산	-	-	-	-	2.4
소듐 자일렌 설포네이트	-	-	3	-	-
소듐 쿠멘 설포네이트	-	-	-	0.3	0.5
DC 3225C	1	1	1	1	1
2-부틸-옥탄올	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03
증백제 1	0.12	0.1	0.18	0.08	0.1
100%까지의 나머지, 향료 / 염료 및/또는 물					
#1: 1N HCl 수용액을 첨가하여 제형의 순 pH를 약 3 내지 약 5의 범위로 조정함. 상기 실시예 (I) 내지 실시예 (II)의 pH는 약 5 내지 약 7이고, 실시예 (III) 내지 실시예 (V)는 약 7.5 내지 약 8.5임.					

[0307]

화합물	HDL 세제 조성물					
	제형					
	I	II	III	IV	V	VI
LAS	11.5	11.5	9	-	4	-
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{2.8} S	-	-	3	18	-	16
C ₁₄ -C ₁₅ E _{2.5} S	11.5	11.5	3	-	16	-
C ₁₂ -C ₁₃ E ₉	-	-	3	2	2	1
C ₁₂ -C ₁₃ E ₇	3.2	3.2	-	-	-	-
C12-C14 알킬 N-메틸 글루카미드 (CFAA) 계면활성제	-	-	-	5	-	3
TPKFA (C12-C14 상층 전체 절단된 (topped whole cut) 지방산)	2	2	-	2	0.5	2
시트르산 (무수)	3.2	3.2	0.5	1.2	2	1.2
Ca 포르메이트	0.1	0.1	0.06	0.1	-	-
Na 포르메이트	0.5	0.5	0.06	0.1	0.05	0.05
ZnCl ₂	0.1	0.05	0.06	0.03	0.05	0.05
소듐 쿠멘 설포네이트	4	4	1	3	1.2	-
붕산염	0.6	0.6	1.5	-	-	-
수산화나트륨	6	6	2	3.5	4	3
에탄올	2	2	1	4	4	3
1,2-프로판다이올	3	3	2	8	8	5
모노에탄올아민	3	3	1.5	1	2.5	1
TEPAE (데트라에틸렌 펜타아민 에톡실레이트)	2	2	-	1	1	1
메틸로프로테아제 1 (선택적)	0.03	0.05	-	0.03	-	0.02
메틸로프로테아제 2	-	-	0.01	-	0.08	-
프로테아제 A (선택적)	-	-	0.01	-	-	-
리파제	-	-	-	0.002	-	-
아밀라제	-	-	-	-	0.002	-
셀룰라제	-	-	-	-	-	0.0001
페린 리아제	0.005	0.005	-	-	-	-
알도스 옥시다제	0.05	-	-	0.05	-	0.02
갈락토스 옥시다제	-	0.04	-	-	-	-
펜타아민 아세테이트 코발트 (III) 염 PAAC	0.03	0.03	0.02	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0.02	0.01	-
SRP1 (음이온성으로 말단 캡핑된 폴리에스테르)	0.2	0.2	-	0.1	-	-
DTPA	-	-	-	0.3	-	-
폴리비닐 피리딘-N-옥사이드 (PVNO)	-	-	-	0.3	-	0.2
증백제 1	0.2	0.2	0.07	0.1	-	-
실리콘 품 방지제	0.04	0.04	0.02	0.1	0.1	0.1

100%까지의 나머지, 향료 / 염료 및/또는 물

화합물	액체 손 씻기세척 (손 씻기용 액체) 세제 조성물					
	제형					
	I	II	III	IV	V	VI
C ₁₂ -C ₁₅ AE _{1.8} S	30	28	25	-	15	10
LAS	-	-	-	5	15	12
파라핀 설포네이트	-	-	-	20	-	-
C ₁₀ -C ₁₈ 알킬 다이메틸 아민 옥사이드	5	3	7	-	-	-
베타인	3	-	1	3	1	-
C ₁₂ 폴리-하이드록시 지방산 아미드	-	-	-	3	-	1
C ₁₄ 폴리-OH 지방산 아미드	-	1.5	-	-	-	-
C ₁₁ E ₉	2	-	4	-	-	20
DTPA	-	-	-	-	0.2	-
트라이-소듐 시트레이트 2 수화물 (증강제)	0.25	-	-	0.7	-	-
다이아민 (다이메틸 아미노프로필 아민; 1,6-헥산 다이아민; 1,3-프로판 다이아민; 2-메틸-1,5-펜tan 다이아민; 1,3-펜tan 다이아민; 1-메틸-다이아민노프로판)	1	5	7	1	5	7
MgCl ₂	0.25	-	-	1	-	-
메틸로프로테아제 1 (선택적)	0.02	0.01	-	0.01	-	0.05
메틸로프로테아제 2	-	-	0.03	-	0.02	-
프로테아제 A (선택적)	-	0.01	-	-	-	-
아밀라제	0.001	-	-	0.002	-	0.001
알도스 옥시다제	0.03	-	0.02	-	0.05	-
소듐 쿠멘 설포네이트	-	-	-	2	1.5	3
펜타아민 아세테이트 코발트 (III) 염	0.01	0.01	0.02	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0.01	0.02	0.01

100%까지의 나머지, 향료 / 염료 및/또는 물

실시예 (I) 내지 실시예 (VI)의 pH는 약 8 내지 약 11임.

화합물	액체 자동 식기세척 세제 조성물				
	제형				
	I	II	III	IV	V
STPP (소듐 트라이폴리 포스페이트)	16.00	16.00	18.00	16.00	16.00
황산칼륨	-	10.00	8.00	-	10.00
1,2-프로판다이올	6.00	0.50	2.00	6.00	0.50
붕산	-	-	-	4.00	3.00
CaCl ₂ 2 수화물	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
비이온성 계면활성제	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
메탈로프로테아제 1 (선택적)	0.10	0.03	-	0.03	-
메탈로프로테아제 2	-	-	0.05	-	0.06
프로테아제 B (선택적)	-	-	-	0.01	-
아밀라제	0.02	-	0.02	0.02	-
알도스 옥시다제	-	0.15	0.02	-	0.01
갈락토스 옥시다제	-	-	0.01	-	0.01
펩타아민 아세테이트 코발트 (III) 염 PAAC (표백제 촉매)	0.01	-	-	0.01	-
DETBCHD	-	0.01	-	-	0.01
100%까지의 나머지, 향료 / 염료 및/또는 물					

[0310]

화합물	과립 및/또는 경제 세제 조성물				
	제형				
	I	II	III	IV	V
C ₁₄ -C ₁₅ AS 또는 TAS (소듐 텔로우 알킬 설페이트)	8	5	3	3	3
LAS	8	-	8	-	7
C ₁₂ -C ₁₅ AE ₅ S	0.5	2	1	-	-
C ₁₂ -C ₁₅ E ₅ 또는 E ₃	2	-	5	2	2
QAS (4 차 암모늄 염)	-	-	-	1	1
제올라이트 A	20	18	11	-	10
SKS-6 (건조 점기) (층상 실리케이트)	-	-	9	-	-
MA/AA (아크릴레이트/말레이트 공중합체)	2	2	2	-	-
AA (폴리아크릴레이트 중합체)	-	-	-	-	4
3Na 시트레이트 2H ₂ O	-	2	-	-	-
시트르산(무수)	2	-	1.5	2	-
DTPA	0.2	0.2	-	-	-
EDDS	-	-	0.5	0.1	-
HEDP	-	-	0.2	0.1	-
PB1 (과봉산나트륨 1 수화물)	3	4.8	-	-	4
과탄산염	-	-	3.8	5.2	-
NOBS	1.9	-	-	-	-
NACA OBS	-	-	2	-	-
TAED	0.5	2	2	5	1
BB1 (3-(3,4-다이하이드로아이소퀴놀리늄)프로판 설포네이트 (DIPS))	0.06	-	0.34	-	0.14
BB2 3-(3,4-다이하이드로아이소퀴놀리늄)-데칸-2-설페이트	-	0.14	-	0.2	-
무수 탄산나트륨	15	18	-	15	15
설페이트	5	12	5	17	3
실리케이트	-	1	-	-	8
메탈로프로테아제 1(선택적)	0.03	-	0.1	0.06	-
메탈로프로테아제 2	-	0.05	-	-	0.1
프로테아제 B (선택적)	-	0.01	-	-	-
프로테아제 C (선택적)	-	-	-	0.01	-
리파제	-	0.008	-	-	-
아밀라제	0.001	-	-	-	0.001
셀룰라제	-	0.0014	-	-	-
펩타리아제	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
알도스 옥시다제	0.03	-	0.05	-	-
펩타아민 아세테이트 코발트 (III) 염 PAAC	-	0.01	-	-	0.05
100%까지의 나머지, 수분 및/또는 미량 성분들*					
* 향료, 염료, 증백제 / SRP1 / Na 카르복시메틸셀룰로오스 / 광표백제 / MgSO ₄ / PVPVI / 거품 억제제 / 고분자량 PEG/접보.					

[0311]

화합물	고밀도 자동 석기세척 세제 조성물					
	I	II	III	IV	V	VI
STPP (소듐 트라이폴리 포스페이트)	-	45	45	-	-	40
3Na 시트레이트 2H ₂ O	17	-	-	50	40.2	-
탄산나트륨	17.5	14	20	-	8	33.6
증탄산염	-	-	-	26	-	-
실리케이트	15	15	8	-	25	3.6
메타실리케이트	2.5	4.5	4.5	-	-	-
PB1 (과봉산나트륨 1 수화물)	-	-	4.5	-	-	-
PB4 (과봉산나트륨 4 수화물)	-	-	-	5	-	-
과탄산염	-	-	-	-	-	4.8
BB1 (3-(3,4-다이하이드로아이소퀴놀리늄)프로판 설포네이트 (DIPS))	-	0.1	0.1	-	0.5	-
BB2 3-(3,4-다이하이드로아이소퀴놀리늄)-데칸-2-설페이트	0.2	0.05	-	0.1	-	0.6
비이온성 세제	2	1.5	1.5	3	1.9	5.9
HEDP	1	-	-	-	-	-
DETPMP	0.6	-	-	-	-	-
펜타아민 아세테이트 코발트 (III) 염 PAAC	0.03	0.05	0.02	-	-	-
파라핀 오일 위노그 (Winog) 70	0.5	0.4	0.4	0.6	-	-
메탈로프로테아제 1 (선택적)	0.072	0.053	-	0.026	-	0.01
메탈로프로테아제 2	-	-	0.053	-	0.059	-
프로테아제 B (선택적)	-	-	-	-	-	0.01
아밀라제	0.012	-	0.012	-	0.021	0.006
리파제	-	0.001	-	0.005	-	-
펙틴 리아제	0.001	0.001	0.001	-	-	-
알도스 옥시다제	0.05	0.05	0.03	0.01	0.02	0.01
BTA (벤조트라이아졸)	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3
폴리카르복실레이트	6	-	-	-	4	0.9
향료	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2

100%까지의 나머지, 수분 및/또는 미량 성분들*

*증백제 / 염료 / SRP1 / Na 카르복시메틸셀룰로오스/ 광표백제 / MgSO₄ / PVPVI/ 거품 억제제 / 고분자량 PEG/ 점토.
실시예 (I) 내지 실시예 (VI)의 pH는 약 9.6 내지 약 11.3임.

[0312]

화합물	정제 세제 조성물							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
STPP (소듐 트라이폴리 포스페이트)	-	48.8	44.7	38.2	-	42.4	46.1	46
3Na 시트레이트 2H ₂ O	20	-	-	-	35.9	-	-	-
탄산나트륨	20	5	14	15.4	8	23	20	-
실리케이트	15	14.8	15	12.6	23.4	2.9	4.3	4.2
리파제	0.001	-	0.01	-	0.02	-	-	-
프로테아제 B	0.01	-	-	-	-	-	-	-
프로테아제 C	-	-	-	-	-	0.01	-	-
메탈로프로테아제 1 (선택적)	0.01	0.08	-	0.04	-	0.023	-	0.05
메탈로프로테아제 2	-	-	0.05	-	0.052	-	0.023	-
아밀라제	0.012	0.012	0.012	-	0.015	-	0.017	0.002
펙틴 리아제	0.005	-	-	0.002	-	-	-	-
알도스 옥시다제	-	0.03	-	0.02	0.02	-	0.03	-
PB1 (과봉산나트륨 1 수화물)	-	-	3.8	-	7.8	-	-	4.5
과탄산염	6	-	-	6	-	5	-	-
BB1 (3-(3,4-다이하이드로아이소퀴놀리늄)프로판 설포네이트 (DIPS))	0.2	-	0.5	-	0.3	0.2	-	-
BB2 3-(3,4-다이하이드로아이소퀴놀리늄)-데칸-2- 설페이트	-	0.2	-	0.5	-	-	0.1	0.2
비이온성 계면활성제	1.5	2	2	2.2	1	4.2	4	6.5
펜타아민 아세테이트 코발트 (III) 염 PAAC	0.01	0.01	0.02	-	-	-	-	-
DETBCHD	-	-	-	0.02	0.02	-	-	-
TAED	-	-	-	-	-	2.1	-	1.6
HEDP	1	-	-	0.9	-	0.4	0.2	-
DETPMP	0.7	-	-	-	-	-	-	-
파라핀 오일 위노그 70	0.4	0.5	0.5	0.5	-	-	0.5	-
BTA (벤조트라이아졸)	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	-
폴리카르복실레이트	4	-	-	-	4.9	0.6	0.8	-
PEG 400-30,000	-	-	-	-	-	2	-	2
글리세롤	-	-	-	-	-	0.4	-	0.5
향료	-	-	-	0.05	0.2	0.2	0.2	0.2

100%까지의 나머지, 수분 및/또는 미량 성분들*

*증백제 / SRP1 / Na 카르복시메틸셀룰로오스/ 광표백제 / MgSO₄ / PVPVI/ 거품 억제제 / 고분자량 PEG/ 점토.
실시예 (I) 내지 실시예 (VII)의 pH는 약 10 내지 약 11.5이고; 실시예 (VIII)의 pH는 8 내지 10임. 실시예 (I) 내지
실시예 (VIII)의 정제 중량은 약 20 그램 내지 약 30 그램임.

[0313]

화합물	액체 경질 표면용 세제 조성물						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
C ₉ -C ₁₁ E ₅	2.4	1.9	2.5	2.5	2.5	2.4	2.5
C ₁₂ -C ₁₄ E ₅	3.6	2.9	2.5	2.5	2.5	3.6	2.5
C ₇ -C ₉ E ₆	-	-	-	-	8	-	-
C ₁₂ -C ₁₄ E ₂₁	1	0.8	4	2	2	1	2
LAS	-	-	-	0.8	0.8	-	0.8
소듐 쿠멘 설포네이트	1.5	2.6	-	1.5	1.5	1.5	1.5
아이사켐(Isachem) ® AS (분지형 알코올 알킬 설페이트)	0.6	0.6	-	-	-	0.6	-
Na ₂ CO ₃	0.6	0.13	0.6	0.1	0.2	0.6	0.2
3Na 시트레이트 2H ₂ O	0.5	0.56	0.5	0.6	0.75	0.5	0.75
NaOH	0.3	0.33	0.3	0.3	0.5	0.3	0.5
지방산	0.6	0.13	0.6	0.1	0.4	0.6	0.4
2-부틸 옥탄올	0.3	0.3	-	0.3	0.3	0.3	0.3
PEG DME-2000®	0.4	-	0.3	0.35	0.5	-	-
PVP (비닐피롤리돈 단일종합체)	0.3	0.4	0.6	0.3	0.5	-	-
MME PEG (2000) ®	-	-	-	-	-	0.5	0.5
제파민(Jeffamine) ® ED-2001 (캡핑된 폴리에틸렌 글리콜)	-	0.4	-	-	0.5	-	-
펜타아민 아세테이트 코발트 (III) 염 PAAC	-	-	-	0.03	0.03	0.03	-
DETBCHD	0.03	0.05	0.05	-	-	-	-
메틸로프로테아제 1 (선택적)	0.07	-	0.08	0.03	-	0.01	0.04
메틸로프로테아제 2	-	0.05	-	-	0.06	-	-
프로테아제 B (선택적)	-	-	-	-	-	0.01	-
아밀라제	0.12	0.01	0.01	-	0.02	-	0.01
리파제	-	0.001	-	0.005	-	0.005	-
펩타 리아제	0.001	-	0.001	-	-	-	0.002
ZnCl ₂	0.02	0.01	0.03	0.05	0.1	0.05	0.02
칼슘 포르메이트	0.03	0.03	0.01	-	-	-	-
PB1 (과봉산나트륨 1 수화물)	-	4.6	-	3.8	-	-	-
알도스 옥시다제	0.05	-	0.03	-	0.02	0.02	0.05
100%까지의 나머지, 향료 / 염료 및/또는 물	실시예 (I) 내지 실시예 (VII)의 pH는 약 7.4 내지 약 9.5임.						

[0314]

성분	HDL 세계 조성물			
	조성물			
	(조성물에 대한 중량%)			
C ₁₂₋₁₅ 알킬에톡시(1.8)설페이트	14.7	11.6		16.31
C _{11.8} 알킬벤젠설포네이트	4.3	11.6	8.3	7.73
C ₁₆₋₁₇ 분지형 알킬설페이트	1.7	1.29		3.09
C ₁₂₋₁₄ 알킬-9-에톡실레이트	0.9	1.07		1.31
C ₁₂ 다이메틸아민옥사이드	0.6	0.64		1.03
시트르산	3.5	0.65	3	0.66
C ₁₂₋₁₈ 지방산	1.5	2.32	3.6	1.52
봉산나트륨(봉사(Borax))	2.5	2.46	1.2	2.53
소듐 C ₁₂₋₁₄ 알킬에톡시 3설페이트			2.9	
C ₁₄₋₁₅ 알킬 7-에톡실레이트			4.2	
C ₁₂₋₁₄ 알킬-7-에톡실레이트			1.7	
Ca 포르메이트	0.09	0.09		0.09
하기 일반 구조식을 갖는 화합물: 비스((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₅ O)n)(CH ₃)-N ⁺ -C _x H _{2x} -N ⁺ -(CH ₃)- 비스((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₅ O)n) (여기서, n = 20 내지 30 이고, x = 3 내지 8 일), 또는 이의 황산화 또는 살포화 변이체			1.2	
랜덤 그래프트 공중합체 ¹		1.46	0.5	
에톡실화 폴리에틸렌이민 ²	1.5	1.29		1.44
다이에틸렌 트라이아민 웨타아세트산	0.34	0.64		0.34
다이에틸렌 트라이아민 웨타(메틸렌 포스폰산)			0.3	
티노팔 AMS-GX		0.06		
티노팔 CBS-X	0.2	0.17		0.29
양친매성 알콕실화 그리스 세정 중합체 ³	1.28	1	0.4	1.93
에탄올	2	1.58	1.6	5.4
프로필렌 글리콜	3.9	3.59	1.3	4.3
다이에틸렌 글리콜	1.05	1.54		1.15
폴리에틸렌 글리콜	0.06	0.04		0.1
모노에탄올아민	3.05	2.41	0.4	1.26
NaOH	2.44	1.8		3.01
소듐 쿠멘설포네이트			1	
소듐 포르메이트		0.11		0.09
물, 미적 성분들(Aesthetics) (염료, 향료) 및 미향 성분들 (효소, 용매, 구조화제)	나머지	나머지	나머지	나머지
1 랜덤 그래프트 공중합체는 폴리에틸렌 옥사이드 골격 및 다수의 폴리비닐 아세테이트 층체를 갖는 폴리비닐 아세테이트로 그래프팅된 폴리에틸렌 옥사이드 공중합체이다. 폴리에틸렌 옥사이드 골격의 분자량은 약 6000이고 폴리에틸렌 옥사이드 대 폴리비닐 아세테이트의 중량비는 약 40 대 60이고, 50 개의 에틸렌 옥사이드 단위당 그래프팅 지점은 1 개 이하임.				
2 -NH 당 20 개의 에톡실레이트 기를 갖는 폴리에틸렌이민 (MW = 600).				
3 양친매성 알콕실화 그리스 세정 중합체는 -NH 당 24 개의 에톡실레이트 기 및 -NH 당 16 개의 프로록실레이트 기를 갖는 폴리에틸렌이민 (MW = 600)임.				

조성물	순한 액체 석기세척 세제 조성물			
	1	2	3	4
선형 알킬 벤젠 설포네이트 (1)	-		-	-
알킬 에톡시 설페이트 (2)	18%	17%	17%	18%
파라핀 설포네이트 (C15)	-	-	-	-
CAP= 코코 아미도 프로필 베타인	-	-	9%	5%
비이온성 (3)	-	-	1%	-
아민 옥사이드 (4)	6%	5.50%	-	4%
알킬폴리글루코사이드				4%
알코올 (5)	-	-	5%	7%
Pura= 폴리프로필렌글리콜	1%	0.80%	-	-
시트레이트	-	-	0.30%	0.60%
염 (6)	1.20%	1.00%	-	0.50%
SCS= 소듐 쿠멘 설포네이트	-	-	0.80%	-
글리세롤	15%	5%	3%	-
Na-락테이트	-	-	-	5%
양이온성 중합체 (7)	0.10%	0.10%	0.30%	0.20%
본 발명의 프로테아제	0.0075	0.005	0.0025	0.03
유퍼란(Euperlan)® 코그니스(Cognis)로부터의 글리콜 다이스테아레이트	0.4	0	0.4	0
수소화 피마자유 턱신(Thixcin)® 엘리 멘티스(Elementis)	0	0.1	0	0.1
운모 (마스프 멀린 수퍼파인(BASF Mearlin superfine))	0	0.05	0	0.05
미량 성분들*	100%까지의 나머지, 물			
pH	9	9	6	6
선택적 미량 성분들*: 염료, 유탕제, 향료, 방부제, 하이드로트륨, 가공 보조제, 및/또는 안정제.				
(1) 선형 알킬 벤젠 설포네이트: LAS: C11.4				
(2) 알킬 에톡시 설페이트: AExS :				
(3) 비이온성: 알킬에톡실레이트				
(4) 다이-메틸 코코 알킬 아민 옥사이드				
(5) 알코올: 에탄올				
(6) 염: NaCl				
(7) 양이온성으로 개질된 하이드록시에틸 셀룰로오스 (에머콜(Amerchol)로부터의 폴리쿼터늄-10 - UCARE LR-400).				

[0316]

전방 투입식(front-loading) 자동 세탁기에 적합한 액체 세탁 세제 조성물								
성분	조성물 (조성물에 대한 중량%)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
알킬 벤젠 설폰산	7	11	4.5	1.2	1.5	12.5	5.2	4
소듐 C ₁₂₋₁₄ 알킬 에톡시 3 설페이트	2.3	3.5	4.5	4.5	7	18	1.8	2
C ₁₄₋₁₅ 알킬 8-에톡실레이트	5	8	2.5	2.6	4.5	4	3.7	2
C ₁₂ 알킬 디에틸 아민 옥사이드	-	-	0.2	-	-	-	-	-
C ₁₂₋₁₄ 알킬 하이드록시에틸 디아메틸 암모늄 클로라이드	-	-	-	0.5	-	-	-	-
C ₁₂₋₁₈ 지방산	2.6	4	4	2.6	2.8	11	2.6	1.5
시트르산	2.6	3	1.5	2	2.5	3.5	2.6	2
프로테아제 *	0.05	0.03	0.04	0.03	0.04	0.03	0.03	0.02
아밀라제	0.1	0.2	0.15	-	0.05	0.5	0.1	0.2
만나나제	0.05	0.1	0.05	-	-	0.1	0.04	-
랜덤 그래프트 공중합체 ¹	1	0.2	1	0.4	0.5	2.7	0.3	1
하기 일반 구조식을 갖는 화합물: 비스((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O)n)(CH ₃)-N ⁺ -C _x H _{2x} -N ⁺ -(CH ₃)- 비스((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O)n) (여기서, n = 20 내지 30 이고, x = 3 내지 8 일), 또는 이의 화산화 또는 설플화 변이체	0.4	2	0.4	0.6	1.5	1.8	0.7	0.3
에톡실화 폴리에틸렌이민 ²	-	-	-	-	-	0.5	-	-
양친매성 알콕실화 그리스 세정 중합체 ³	0.1	0.2	0.1	0.2	0.3	0.3	0.2	0.3
다이에톡실화 폴리(1,2-프로필렌 테레프탈레이트)	-	-	-	-	-	-	0.3	-
다이에틸랜트라이아민펜타(메틸렌포스fon) 산	0.2	0.3	-	-	0.2	-	0.2	0.3
하이드록시에탄 디아포스폰산	-	-	0.45	-	-	1.5	-	0.1
FWA (영광 중백제)	0.1	0.2	0.1	-	-	0.2	0.05	0.1
용매 (1,2-프로판다이올, 에탄올),	3	4	1.5	1.5	2	4.3	2	1.5
수소화 페마자유 유도체	0.4	0.4	0.3	0.1	0.3	-	0.4	0.5
봉산	1.5	2.5	-	1.5	1.5	0.5	1.5	1.5
Na 포르메이트	-	-	-	1	-	-	-	-
가역적 프로테아제 억제제 ⁴	-	-	0.002	-	-	-	-	-
향료	0.5	0.7	0.5	0.5	0.8	1.5	0.5	0.8
향료 마이크로캡슐 슬러리 (30%am)	0.2	0.3	0.7	0.2	0.05	0.4	0.9	0.7
에톡실화 티오펜 색조화 염료 ⁵	0.005	0.007	0.01	0.008	0.008	0.007	0.007	0.008
완충제 (수산화나트륨, 모노에탄올아민)	pH 8.2로							
물 및 미량 성분들 (폼 방지제, 미적 성분들)	100%까지							

¹랜덤 그래프트 공중합체는 폴리에틸렌 옥사이드 골격 및 다수의 폴리비닐 아세테이트 측쇄를 갖는, 폴리비닐 아세테이트로 그래프팅된 폴리에틸렌 옥사이드 공중합체이다. 폴리에틸렌 옥사이드 골격의 분자량은 약 6000이고, 폴리에틸렌 옥사이드 대 폴리비닐 아세테이트의 중량비는 약 40 대 60이고, 50 개의 에틸렌 옥사이드 단위 당 그래프팅 점은 1 개 이하이다.

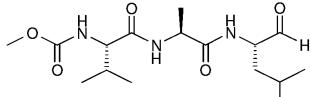
²-NH 당 20 개의 에톡실레이트 기를 갖는 폴리에틸렌이민 (MW = 600).

³양친매성 알콕실화 그리스 세정 중합체는 -NH 당 24 개의 에톡실레이트 기 및 -NH 당 16 개의 프로포실레이트 기를 갖는 폴리에틸렌이민 (MW = 600)임.

⁵에톡실화 디오펜 색조화 염료는 미국 특허 제 7,208,459 B2 호에 기재되어 있음.

*비고: 제품에 첨가되는 활성 단백질의 %로서 표시되는 프로테아제를 제외하고, 모든 효소 수준은 % 효소 원료로서 표시함.

⁴하기 구조의 가역적 프로테아제 억제제:



상부-투입식(top-loading) 자동 세탁기에 적합한 액체 세탁 세제 조성물								
성분	조성물							
	(조성물에 대한 중량%)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
C ₁₂₋₁₅ 알킬에톡시(1.8)설페이트	20.1	15.1	20	15.1	13.7	16.7	10	9.9
C _{11,8} 알킬벤젠설포네이트	2.7	2	1	2	5.5	5.6	3	3.9
C ₁₆₋₁₇ 분지형 알킬설페이트	6.5	4.9		4.9	3	9	2	
C ₁₂₋₁₄ 알킬-9-에톡실레이트	0.8	0.8	0.8	0.8	8	1.5	0.3	11.5
C ₁₂ 디이메틸아민 옥사이드		0.9						
시트르산	3.8	3.8	3.8	3.8	3.5	3.5	2	2.1
C ₁₂₋₁₈ 지방산	2	1.5	2	1.5	4.5	2.3		0.9
프로테아제*	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
아밀라제 1	0.7	0.3	0.6	0.3	0.6	0.4		
아밀라제 2								1.1
만나나제	0.1					0.1		
（笑） 퀘이트 리아제	0.1					0.2		
봉사	3	3			2	3	3	3.3
Na & Ca 포르메이트	0.2	0.2		0.2	0.2		0.7	
하기 일반 구조식을 갖는 화합물: 비스((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₅ O)n)(CH ₃)-N ⁺ -C ₂ H ₅ -N ⁺ -(CH ₃) ²								
비스((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₅ O)n) (여기서, n = 20 내지 30이고, x = 3 내지 8임), 또는 이의 황산화 또는 질산화 변이체	1.6	1.6	3	1.6	2	1.6	1.3	1.2
랜덤 그래프트 공중합체 ¹	0.4	0.2	1	0.5	0.6	1	0.8	1
다이에틸렌 트리아민 펜타아세트산	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.3	0.8	
티노팔 AMS-GX (증백제)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.1	
티노팔 CBS-X (증백제)						0.1		0.2
양친배성 알콕실화 그라스 세정 증합제 ³	1	1.3	1.3	1.4	1	1.1	1	1
텍스케어 240N (클라리언트(Clariant))				1				
에탄올	2.6	2.6	2.6	2.6	1.8	3	1.3	
프로필렌 글리콜	4.6	4.6	4.6	4.6	3	4	2.5	
다이에틸렌 글리콜	3	3	3	3	3	2.7	3.6	
폴리에틸렌 글리콜	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.3	0.1	1.4
모노에탄올아민	2.7	2.7	2.7	2.7	4.7	3.3	1.7	0.4
트라이에탄올아민							0.9	
NaOH	pH 8.3 으로	pH 8.3 으로	pH 8.3 으로	pH 8.3 으로	pH 8.3 으로	pH 8.3 으로	pH 8.3 으로	pH 8.5 으로
거품 억제제								
염료	0.01	0.01	0.01		0.01	0.01	0.01	0
향료	0.5	0.5	0.5	0.5	0.7	0.7	0.8	0.6
향료 마이크로캡슐슬러리 (30%am)	0.2	0.5	0.2	0.3	0.1	0.3	0.9	1
에톡실화 티오펜 색조화 염료 ⁵	0.003	0.002	0.002	0.005	0.002	0.004	0.004	0.003
물	나머지	나머지	나머지	나머지	나머지	나머지	나머지	나머지
1 랜덤 그래프트 공중합체는 폴리에틸렌 옥사이드 골격 및 다수의 폴리비닐 아세테이트로 그래프팅된 폴리에틸렌 옥사이드이다. 폴리에틸렌 옥사이드 골격의 분자량은 약 6000이고, 폴리에틸렌 옥사이드 대 폴리비닐 아세테이트의 중량비는 약 40 내지 60이고, 50개의 에틸렌 옥사이드 단위 당 그래프팅 점은 1개 이하이다.								
3 양친배성 알콕실화 그라스 세정 증합제는 -NH 당 24개의 에톡실레이트 기 및 -NH 당 16개의 프로포실레이트 기를 갖는 폴리에틸렌이민 (MW = 600)임.								
5 에톡실화 티오펜 색조화 염료는 미국 특허 제 7,208,459 B2 호에 기재되어 있음.								
*비고: 제품에 첨가되는 활성 단백질의 %로서 표시되는 프로테아제를 제외하고, 모든 효소 수준은 % 효소 원료로서 표시함.								

과립 세제 조성물						
성분	1	2	3	4	5	6
지방족 탄소 사슬 길이가 C ₁₁ -C ₁₂ 인 선형 알킬벤센설포네이트	15	12	20	10	12	13
기타 계면활성제	1.6	1.2	1.9	3.2	0.5	1.2
포스페이트 증강제(들)	2	3	4			
제올라이트		1		1	4	1
실리케이트	4	5	2	3	3	5
탄산나트륨	2	5	5	4	0	3
폴리아크릴레이트 (MW 4500)	1	0.6	1	1	1.5	1
카르복시 메틸 셀룰로오스(씨피케르코(CPKelco)로부터의 편팩스 BDA)	1	-	0.3	-	1.1	-
셀룰라제	0.23	0.17	0.5	0.2	0.2	0.6
프로테아제	0.23	0.17	0.5	0.2	0.2	0.6
아밀라제	0.23	0.17	0.5	0.2	0.2	0.6
영광 증백제(들)	0.16	0.06	0.16	0.18	0.16	0.16
다이에틸렌트라이아민 펜타아세트산 또는 에틸렌 디아민 테트라아세트산	0.6		0.6	0.25	0.6	0.6
MgSO ₄	1	1	1	0.5	1	1
표백제(들) 및 표백 활성제(들)	6.88		6.12	2.09	1.17	4.66
에톡실화 티오펜 색조화 염료 ⁵	0.002	0.001	0.003	0.003	-	-
시바 스페셜티 케미칼스(Ciba Specialty Chemicals)로부터의 다이액트 바이올렛 9				0.0006	0.0004	0.0006
설페이트/시트르산/증탄산나트륨/수분/향료				100%까지의 나머지		
5 에톡실화 티오펜 색조화 염료는 미국 특허 제 7,208,459 B2 호에 기재되어 있음.						

[0318]

[0319]

성분	과립 세탁 세제 조성물 및 이의 성분					
	1	2	3	4	5	6
지방족 탄소 사슬 길이가 C ₁₁ -C ₁₂ 인 선형 알킬벤젠설포네이트	15	12	20	10	12	13
기타 계면활성제	1.6	1.2	1.9	3.2	0.5	1.2
포스페이트 증강제(들)	2	3	4			
제올라이트		1		1	4	1
실리케이트	4	5	2	3	3	5
탄산나트륨	2	5	5	4	0	3
폴리아크릴레이트 (MW 4500)	1	0.6	1	1	1.5	1
카르복시 베틸 셀룰로오스	1	-	0.3	-	1.1	-
셀룰라제 (15.6mg/g)	0.23	0.17	0.5	0.2	0.2	0.6
프로테아제	0.23	0.17	0.05	0.2	0.03	0.1
아밀라제 (14mg/g)	0.23	0.17	0.5	0.2	0.2	0.6
만나나제 (4mg/g)	0.1			0.1		0.1
리파제 (18.6mg/g)	0.2		0.1		0.3	
형광 증백제(들)	0.16	0.06	0.16	0.18	0.16	0.16
다이에틸렌트라이아민 펜타아세트산 또는 에틸렌 다이아민 테트라아세트산						
MgSO ₄	0.6		0.6	0.25	0.6	0.6
표백제(들) 및 표백 활성제(들)	1	1	1	0.5	1	1
에톡실화 티오펜 색조화 염료 ⁵	6.88		6.12	2.09	1.17	4.66
시마 스페셜티 케미칼스로부터의 다이헥센 바이올렛 9	0.002	0.001	0.003	0.003	-	-
설페이트/시트르산/증탄산나트륨/수분/향료				0.0006	0.0004	0.0006
100%까지의 나머지						

⁵에톡실화 티오펜 색조화 염료는 미국 특허 제 7,208,459 B2 호에 기재되어 있음.

[0320]

성분	과립 세탁 세제 조성물 및 이의 성분				
	7	8	9	10	11
계면활성제					
C ₁₆₋₁₇ 분지형 알킬설페이트	3.55	15.8			
C ₁₂₋₁₄ 알킬설페이트			1.5		
지방족 사슬 길이가 C ₁₁ -C ₁₂ 인 소듐 선형 알킬벤젠설포네이트	9.6		10.6	7.5	9
소듐 C _{14/15} 알코올 에톡시-3-설페이트	1.15			2.88	
소듐 C _{14/15} 알킬설페이트	2.37				
평균 7 몰의 에톡실화를 갖는 C _{14/15} 알코올 에톡실레이트				1.17	1
모노-C ₈₋₁₀ 알킬모노-하이드록시에틸다이-메틸4차 암모늄 클로라이드					0.45
다이메틸하이드록실 에틸 라우릴 암모늄 클로라이드			0.18		
제올라이트 A	13.9	4.7	0.01	2.9	1.8
규산나트륨 1.6.비	4	0.2		4	4
규산나트륨 2.35.비			8		
시트르산				2.5	1.4
소듐 트라이폴리포스페이트			5		
탄산나트륨	24.1	30	16.9	24.4	21
노나노일옥시벤젠설포네이트	5.78	2.81	0.96		
옥사지리디늄계 표백 부스터				0.03	0.017
테트라소듐 S.S.-에틸렌다이아민다이석시네이트				0.2	
다이에틸렌트라이아민 펜타(에틸렌 포스폰산), 헵타소듐 염	0.61				0.33
하이드록시에탄 다이메틸렌 포스폰산				0.29	0.45
에틸렌 다이아민 테트라아세테이트			0.27		
MgSO ₄			0.47	0.5994	0.782
과탄산나트륨	7	4.4		15.9	19.1
테트라아세틸 에틸렌 다이아민				3.3	4.6
과봉산나트륨 1 수화물			1.2		
카르복시메틸 셀룰로오스					
(에를 들어, 씨피겔코로부터의 편파스 BDA)	0.1		0.17	1.69	0.23
소듐 아크릴산/말레산 공중합체 (70/30)	0.0236	3.8		2	2.5
소듐 폴리아크릴레이트 (소칼란 PA30 CL)	4		0.84		
테레프탈레이트 중합체				0.23	
폴리에틸렌 글리콜/비닐 아세테이트 웨덤 그래프트 공중합체			0.89	0.89	0.91
광표백제-아연 프탈로시아닌 테트라설포네이트			0.005	0.001	0.002
C.I. 형광 증백제 260	0.11	0.15	0.04	0.23	0.15
C.I. 형광 증백제 351(티노팔® CBS)			0.1		
기噜 억제제 과립		0.25		0.07	0.04
소수성으로 개질된 카르복시 메틸 셀룰로오스 (편파스® SH-1)			0.019	0.028	
벤토나이트			8.35		
기타(염료, 향료, 가공 보조제, 수분 및 황산나트륨)	나머지	나머지	나머지	나머지	나머지

[0321]

단위 투여량 세제 조성물		1	2	3	4	5
성분						
알킬 벤젠 설폰산 C 11-13, 23.5% 2-페닐 이성체	14.5	14.5	14.5	14.5	14.5	
C ₁₂₋₁₄ 알킬 에톡시 3 설플레이트	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	
C ₁₂₋₁₄ 알킬 7-에톡실레이트	13	13	13	13	13	
시트르산	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	
지방산	14.8	14.8	14.8	14.8	14.8	
효소 (활성이 아닌 원료의 %로서)	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	
본 발명의 프로테아제 (% 활성으로서)	0.05	0.1	0.02	0.03	0.03	
에톡실화 폴리에틸렌아민 ¹	4	4	4	4	4	
시리즈(Series) 1 GG36 프로테아제 (% 활성으로서)	0.02	0	0.01	0.02	0.03	
하이드록시에탄 디아포스폰산	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	
증백제	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	
P-다이올	15.8	13.8	13.8	13.8	13.8	
글리세롤	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	
MEA (모노에탄올아민) 증백제 안정제	8	8	8	8	8	
TIPA (트라이아이소프로판올아민)	-	-	2	-	-	
TEA (트라이에탄올아민)	-	2	-	-	-	
쿠멘 설포네이트	-	-	-	-	2	
사이클로헥실 디아메탄올	-	-	-	2	-	
물	10	10	10	10	10	
구조화제	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	
향료	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	
완충제 (모노에탄올아민)	pH 8.0 으로					
용매 (1,2 프로판다이올, 에탄올)	100%까지					
¹ -NH 당 20 개의 에톡실레이트 기를 갖는 폴리에틸렌아민 (MW = 600).						

다중 구획 단위 투여량 세제 조성물	
베이스 조성물 1	%
성분	
글리세롤 (min 99)	5.3
1,2-프로판다이올	10
시트르산	0.5
모노에탄올아민	10
가성 소다	-
디퀘스트(Dequest) 2010	1.1
아황산칼륨	0.2
비아온성 마를리팔(Marlipal) C24EO7	20.1
HLAS (계면활성제)	24.6
광학 증백제 FWA49	0.2
C12-15 지방산	16.4
중합체 루텐시트(Lutensit) Z96	2.9
폴리에틸렌아민 에톡실레이트 PEI600 E20	1.1
MgCl ₂	0.2
용매 (1,2 프로판다이올, 에탄올)	100%까지

[0322]

조성물	다중-구획 제형					
	1			2		
구획	A	B	C	A	B	C
각각의 구획의 부피	40 ml	5 ml	5 ml	40 ml	5 ml	5 ml
활성 재료 (총량%)						
향료	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
염료	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
TiO ₂	0.1	-	-	-	0.1	-
아황산나트륨	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3
아큐솔(Acusol) 305, 롬 앤드 하스(Rohm&Haas)	1.2			2	-	-
수소화 피마자유	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14
베이스 조성물 1	100%까지 첨가	100%까지 첨가	100%까지 첨가	100%까지 첨가	100%까지 첨가	100%까지 첨가

[0323]

포스페이트-무함유 세제: IEC-60436 WFK 유형 B (3g/l에서 pH=10.4)	
성분	중량%
소듐 시트레이트 탈수물	30
말레산/ 아크릴산 공중합체 소듐 염 소칼란® CP5 BASF	12
과봉산나트륨 1 수화물	5
TAED	2
소듐 다이실리케이트: 프로틸(Protile) A (코그니스(Cognis))	25
선행 지방 알코올 에톡실레이트	2
탄산나트륨 무수	100까지 첨가

[0324]

포스페이트-함유 세제: IEC-60436 WFK 유형 C (3 g/l에서 pH=10.5)	
성분	중량%
소듐 트라이폴리포스페이트	23
소듐 시트레이트 탈수물	22.3
말레산/ 아크릴산 공중합체 소듐 염	4
과봉산나트륨 1 수화물	6
TAED	2
소듐 다이실리케이트: 프로틸 A (코그니스)	5
선행 지방 알코올 에톡실레이트	2
탄산나트륨 무수	100까지 첨가

[0325]

상부 투입식 자동 세탁기 (1 & 2) 및 전방 투입식 세탁기 (3)에 적합한 액체 세탁 세제 조성물.			
성분	조성물		
	(조성물에 대한 중량%)		
	1	2	3
C ₁₂₋₁₅ 알킬에톡시(1.8)설페이트	14.7	11.6	
C ₁₁₋₈ 알킬벤젠 설포네이트	4.3	11.6	8.3
C ₆₋₁₇ 분지형 알킬설페이트	1.7	1.29	
C ₁₂₋₁₄ 알킬-9-에톡실레이트	0.9	1.07	
C ₁₂ 다이메틸아민 옥사이드	0.6	0.64	
시트르산	3.5	0.65	3
C ₁₂₋₁₈ 지방산	1.5	2.32	3.6
봉산나트륨(봉사)	2.5	2.46	1.2
소듐 C ₁₂₋₁₄ 알킬에톡시 3설페이트			2.9
C ₁₄₋₁₅ 알킬 7-에톡실레이트			4.2
C ₁₂₋₁₄ 알킬-7-에톡실레이트			1.7
C ₆ 포르메이트	0.09	0.09	
하기 일반 구조식을 갖는 화합물: 비스((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O)n)(CH ₃)-N ⁺ -C _x H _{2x} -N ⁺ -(CH ₃)-비스((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O)n) (여기서, n = 20 내지 30이고, x = 3 내지 8임), 또는 이의 황산화 또는 살포화 변이체			1.2
랜덤 그래프트 공중합체 ¹		1.46	0.5
에톡실화 폴리에틸렌이민 ²	1.5	1.29	
다이에틸렌 트라이아민 펜타아세트산	0.34	0.64	
다이에틸렌 트라이아민 펜타(메틸렌 포스폰산)			0.3
티노팜 AMS-GX		0.06	
티노팜 CBS-X	0.2	0.17	
양친매성 알콕실화 그리스 세정 중합체 ³	1.28	1	0.4
에탄올	2	1.58	1.6
프로필렌 글리콜	3.9	3.59	1.3
다이에틸렌 글리콜	1.05	1.54	
폴리에틸렌 글리콜	0.06	0.04	
모노에탄올아민	3.05	2.41	0.4
NaOH	2.44	1.8	
소듐 쿠멘 설포네이트			1
소듐 포르메이트		0.11	
물, 미적 성분들(염료, 향료) 및 미량 성분들(효소, 용매, 구조화제)	나머지	나머지	나머지
1 랜덤 그래프트 공중합체는 폴리에틸렌 옥사이드, 골격 및 다수의 폴리비닐 아세테이트 층체를 갖는, 폴리비닐 아세테이트로 그래프팅된 폴리에틸렌 옥사이드 공중합체이다. 폴리에틸렌 옥사이드 골격의 분자량은 약 6000이고, 폴리에틸렌 옥사이드 대 폴리비닐 아세테이트의 중량비는 약 40 내지 60이고, 50 개의 에틸렌 옥사이드 단위 당 그래프팅 점은 1 개 이하이다.			
2 -NH 당 20 개의 에톡실레이트 기를 갖는 폴리에틸렌이민 (MW = 600).			
3 양친매성 알콕실화 그리스 세정 중합체는 -NH 당 24 개의 에톡실레이트 기 및 -NH 당 16 개의 프로포실레이트 기를 갖는 폴리에틸렌이민 (MW = 600)임			

[0326]

상부 투입식 자동 세탁기 (1-3) 및 전방 투입식 세탁기 (4-5)에 적합한 과립 세탁제 조성물. 본 발명의 프로테아제가 이를 제형에 개별적으로첨가된다.					
성분	1	2	3	4	5
C16-17 분지형 알킬 살레이트	3.55				
C12-14 알킬 살레이트			1.5		
지방족 사슬 길이가 C ₁₁ -C ₁₂ 인 소듐 선형 알킬 벤젠설포네이트	9.6	15.8	10.6	7.5	9
소듐 C _{14/15} 알코올 에톡시-3-설페이트	1.15			2.88	
소듐 C _{14/15} 알킬 살레이트	2.37				
평균 7 몰의 에톡실화물 갖는 C _{14/15} 알코올 에톡실레이트				1.17	1
모노-C ₈₋₁₀ 알킬 모노-하이드록시에틸 다이-메틸 4 차 암모늄 클로라이드					0.45
다이 메틸 하이드록실 에틸 라우릴 암모늄 클로라이드			0.18		
제윤화아이트 A	13.9	4.7	0.01	2.9	1.8
규산나트륨 1.6.비	4	0.2		4	4
규산나트륨 2.35.비			8		
시트르산				2.5	1.4
소듐 트라이폴리포스페이트			5		
탄산나트륨	24.1	30	16.9	24.4	21
노나노일옥시시멘설포네이트	5.78	2.81	0.96		
옥사자리디늄계 표백 부스터				0.03	0.017
테트라소듐 S,S-에틸렌다이아민다이석시네이트				0.2	
다이에틸렌트라이아민 펜타(메틸렌 포스폰산), 펜타소듐 염	0.61				0.33
하이드록시에탄 다이메틸 렌 포스폰산				0.29	0.45
에틸렌 다이아민 테트라아세테이트			0.27		
MgSO ₄			0.47	0.5994	0.782
과탄산나트륨	7	4.4		15.9	19.1
테트라 아세틸 에틸렌 다이아민				3.3	4.6
과봉산나트륨 1 수화물			1.2		
카르복시메틸 셀룰로오스(예를 들어 씨퍼겔코로부터의 편릭스 BDA)	0.1		0.17	1.69	0.23
소듐 아크릴산/발레산 공중합체 (70/30)	0.0236	3.8		2	2.5
소듐 폴리아크릴레이트(소칼란 PA30 CL)	4		0.84		
테데프탈레이트 중합체				0.23	
폴리에틸렌 글리콜/비닐 아세테이트 랜덤 그래프트 공중합체			0.89	0.89	0.91
광표백제-아연 프탈로시아닌 테트라설포네이트			0.005	0.001	0.002
C.I. 형광 증백제 260	0.11	0.15	0.04	0.23	0.15
C.I. 형광 증백제 351(티노팔® CBS)			0.1		
기름 억제제 과립		0.25		0.07	0.04
소수성으로 개질된 카르복시 메틸 셀룰로오스(편릭스 @ SH-1)			0.019	0.028	
벤토나이트			8.35		
기타(염료, 향료, 가공 보조제, 수분 및 황산나트륨)	나머지	나머지	나머지	나머지	나머지

[0327]

[0328]

성분	식기세척 세제 젤 조성물				
	1 (중량%)	2 (중량%)	3 (중량%)	4 (중량%)	5 (중량%)
폴리터센트(Polytergent) ® SLF-18	1	1.3	0.8	1	0.9
소듐 벤조에이트(33% 활성)	0.61	0.61	0.61	0.6	0.6
잔탄 겹	1	0.8	1.2	1	1.1
황산나트륨	10	10	10	8	10
향료	0.03	0.05	0.03	0.06	0.1
규산나트륨					2
시트르산(50% 활성)	12.5		12		
GLDA		7		8	
프로테아제 1(44 mg 활성/g)	0.7		0.3		
4-포르밀-페닐 보론산			0.05		
프로테아제 2(10 mg/g), 캡슐화됨		2		0.6	
프로테아제 3(48 mg 활성/g)					0.5
프로테아제 4(123 mg 활성/g)					
에탄올				0.3	
수산화칼륨(45% 활성)	14.6	14.6	14.6	14	
염화칼슘(25% 활성)	1.8	1.8	1.8	1.1	0.4
염료	0.05	0.05	0.05	0.05	0.02
프록셀(Proxcel) GXL™ (19% 활성)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
아큐솔™ 8209	0.34	0.34	0.3	0.35	0.3
아큐솔™ 425N(50% 활성)	3	3	3.5	2.5	2
아밀라제(25 mg/g 활성)	0.2	0.5	0.4	0.3	0.1
물 & 기타 부가 성분	100%까지의 나머지	100%까지의 나머지	100%까지의 나머지	100%까지의 나머지	100%까지의 나머지

[0329]

분말 자동 식기세척 조성물	
조성물 1	
성분	중량%
비이온성 계면활성제	0.4-2.5%
소듐 메타실리케이트	0-20%
소듐 다이실리케이트	0-20%
삼인산나트륨	0-40%
탄산나트륨	0-20%
과봉산나트륨	2-9%
테트라아세틸 에틸렌 다이아민 (TAED)	1-4%
황산나트륨	5-33%
효소	0.0001-0.1%
조성물 2	
성분	중량%
비이온성 계면활성제 (예를 들어 알코올 에톡실레이트)	1-2%
소듐 다이실리케이트	2-30%
탄산나트륨	10-50%
소듐 포스포네이트	0-5%
트라이소듐 시트레이트 탈수물	9-30%
니트릴로트라이소듐 아세테이트 (NTA)	0-20%
과봉산나트륨 1 수화물	5-10%
테트라아세틸 에틸렌 다이아민 (TAED)	1-2%
폴리아크릴레이트 종합체 (예를 들어 말레산/아크릴산 공중합체)	6-25%
효소	0.0001-0.1 %
향료	0.1-0.5%
물	5-10
조성물 3	
성분	중량%
비이온성 계면활성제	0.5-2.0%
소듐 다이실리케이트	25-40%
소듐 시트레이트	30-55%
탄산나트륨	0-29%
증탄산나트륨	0-20%
과봉산나트륨 1 수화물	0-15%
테트라아세틸 에틸렌 다이아민 (TAED)	0-6%
말레산/아크릴산 공중합체	0-5%
검토	1-3%
폴리아미노산	0-20%
소듐 폴리아크릴레이트	0-8%
효소	0.0001-0.1 %

[0330]

분말 자동 식기세척 조성물	
조성물 4	
성분	중량%
비이온성 계면활성제	1-2%
제올라이트 MAP	0-42%
소듐 다이실리케이트	0-34%
소듐 시트레이트	0-12%
탄산나트륨	0-20%
과봉산나트륨 1 수화물	7-15%
테트라아세틸 에틸렌 다이아민 (TAED)	0-3%
중합체	0-4%
말레산/아크릴산 공중합체	0-5%
유기 포스포네이트	0-4%
첨보	1-2%
효소	0.0001-0.1 %
황산나트륨	나머지
조성물 5	
성분	중량%
비이온성 계면활성제	1-7%
소듐 다이실리케이트	18-30%
트라이소듐 시트레이트	10-24%
탄산나트륨	12-20%
모노페설페이트 (2 KHSO ₄ · K ₂ SO ₄)	15-21%
표백 안정제	0.1-2%
말레산/아크릴산 공중합체	0-6%
다이에틸렌 트라이아민 펜타아세테이트, 펜타소듐 염	0-2.5%
효소	0.0001-0.1%
황산나트륨, 물	나머지

[0331]

세정 계면활성제 시스템을 갖는 분말 및 액체 식기세척 조성물	
성분	중량%
비이온성 계면활성제	0-1.5%
옥타데실 다이메틸아민 N-옥사이드 2 수화물	0-5%
옥타데실 다이메틸아민 N-옥사이드 2 수화물 및 헥사데실다이메틸 아민 N 옥사이드 탈수물의 80:20 중량비 C18/C16 블렌드	0-4%
옥타데실 비스(하이드록시에틸)아민 N-옥사이드 무수 및 헥사데실 비스(하이드록시에틸)아민 N-옥사이드 무수의 70:30 중량비 C18/C16 블렌드	0-5%
평균 에톡실화도가 3 인 C13-C15 알킬 에톡시설페이트	0-10%
평균 에톡실화도가 3 인 C12-C15 알킬 에톡시설페이트	0-5%
평균 에톡실화도가 12 인 C13-C15 에톡실화 알코올	0-5%
평균 에톡실화도가 9 인 C 12-C 15 에톡실화 알코올의 블렌드	0-6.5%
평균 에톡실화도가 30 인 C 13-C 15 에톡실화 알코올의 블렌드	0-4%
소듐 다이실리케이트	0-33%
소듐 트라이폴리포스페이트	0-46%
소듐 시트레이트	0-28%
시트르산	0-29%
탄산나트륨	0-20%
과봉산나트륨 1 수화물	0-11.5%
테트라아세틸 에틸렌 다이아민 (TAED)	0-4%
말레산/아크릴산 공중합체	0-7.5%
황산나트륨	0-12.5%
효소	0.0001-0.1 %

[0332]

비수성 액체 자동 식기세척 조성물	
성분	중량%
액체 비이온성 계면활성제 (예를 들어 알코올 에톡실레이트)	2.0-10.0%
알칼리 금속 실리케이트	3.0-15.0%
알칼리 금속 포스페이트	0-40.0%
고급 글리콜, 폴리글리콜, 폴리옥사이드, 글리콜 에테르로부터 선택되는 액체 담체	25.0-45.0%
안정제 (예를 들어 인산과 C16-C18 알칸올의 부분적 에스테르)	0.5-7.0%
폼 억제제 (예를 들어 실리콘)	0-1.5%
효소	0.0001-0.1 %

[0333]

비수성 액체 식기세척 조성물	
성분	중량%
액체 비이온 성 계면활성제 (예를 들어 알코올 에톡실레이트)	2.0-10.0%
규산나트륨	3.0-15.0%
알칼리 금속 카르보네이트	7.0-20.0%
소듐 시트레이트	0.0-1.5%
안정화 시스템(예를 들어 미분된 실리콘과 저분자량 다이알킬 폴리글리콜 에테르의 혼합물)	0.5-7.0%
저분자량 폴리아크릴레이트 중합체	5.0-15.0%
점토 젤 증점제 (예를 들어 벤토나이트)	0.0-10.0%
하이드록시프로필 셀룰로오스 중합체	0.0-0.6%
효소	0.0001-0.1 %
고급 글리콜, 폴리글리콜, 폴리옥사이드 및 글리콜 에테르로부터 선택되는 액체 담체	나머지

[0334]

요변성 액체 자동 식기세척 조성물	
성분	중량%
C 12-C 14 지방산	0-0.5%
블록 광중합체 계면활성제	1.5-15.0%
소듐 시트레이트	0-12%
소듐 트라이폴리포스페이트	0-15%
탄산나트륨	0-8%
알루미늄 트라이스테아레이트	0-0.1%
소듐 쿠멘 설포네이트	0-1.7%
폴리아크릴레이트 중점제	1.32-2.5%
소듐 폴리아크릴레이트	2.4-6.0%
붕산	0-4.0%
소듐 포르메이트	0-0.45%
칼슘 포르메이트	0-0.2%
소듐 n-데실다이페닐 옥사이드 다이설포네이트	0-4.0%
모노에탄올 아민 (MEA)	0-1.86%
수산화나트륨 (50%)	1.9-9.3%
1,2-프로판다이올	0-9.4%
효소	0.0001-0.1%
거품 억제제, 염료, 향료, 물	나머지

[0335]

액체 자동 식기세척 조성물	
성분	중량%
알코올 에톡실레이트	0-20%
지방산 에스테르 설포네이트	0-30%
소듐 도데실 살레이트	0-20%
알킬 폴리글리코사이드	0-21%
올레산	0-10%
소듐 다이실리케이트 1 수화물	0-33%
소듐 시트레이트 2 수화물	0-33%
소듐 스테아레이트	0-2.5%
과봉산나트륨 1 수화물	0-13%
테트라아세틸 에틸렌 다이아민 (TAED)	0-8%
말레산/아크릴산 광중합체	4-8%
효소	0.0001-0.1%

[0336]

보호된 표백제 입자를 함유하는 액체 자동 식기세척 조성물	
성분	중량%
규산나트륨	5-10%
테트라포타슘 피로포스페이트	0-25%
삼인산나트륨	0-2%
탄산칼륨	4-8%
보호된 표백제 입자, 예를 들어 염소	5-10%
중합체성 증점제	0.7-1.5%
수산화칼륨	0-2%
효소	0.0001-0.1 %
물	나머지

[0337]

화합물	모델 세제 A의 조성:		모델 세제 B의 조성:	
	양 g/100 g	% 활성 성분	양 g/100 g	% 활성 성분
계면활성제				
Na-LAS (92%) (나코놀(Nacconol)90G) (음이온성)(선행 알킬벤젠설포네이트)	10.87	10	10.87	10
스테올(STEOL) CS-370E (70%) (음이온성), CH3(CH2)m-(OCH2CH2)3--OSO3- (여기서, m~ 11-13)	7.14	5	7.14	5
바이오-소프트(Bio-soft) N25-7 (99.5%) (비이온성) : CH3(CH2)m-(OCH2CH2h-OH (여기서, m~ 11-14)	5	5	5	5
울레산(지방산)	2	2	2	2
용매				
H2O	62	65	62	65
에탄올	0.5	0.5	0.5	0.5
STS(소듐p-톨루엔설포네이트(40%»	3.75	1.5	3.75	1.5
모노프로필렌글리콜	2	2	2	2
증강제				
트라이-소듐-시트레이트	4	4	0	0
다이에틸렌트라이아민 펜타아세트산(DTPA)	0	0	1.5	1.5
트라이에탄올아민(TEA)	0.5	0.5	0.5	0.5
안정제				
붕산	1.5	1.5	1.5	1.5
미량 성분들				
10N NaOH (pH 8.5로 조절)	0.8	0.8	0.8	0.8

액체 세제 및 세정제 조성물								
성분	E1	E2	E3	C1	C2	C3	C4	C5
겔란 검	0.2	0.2	0.15	0.15				
잔탄 검			0.15		0.15	0.5	0.2	
폴리아크릴레이트(카보폴 아쿠아(Carbopol Aqua) 30)	0.4	0.4					0.6	0.6
7EO를 갖는 C ₁₂₋₁₄ -지방 알코올	22	10	10	10	10	10	10	10
C ₉₋₁₃ -알킬벤젠설포네이트, Na 염		10	10	10	10	10	10	10
C ₁₂₋₁₄ -알킬폴리글리코사이드	1							
시트르산	1.6	3	3	3	3	3	3	3
디퀘스트® 2010	0.5	1	1	1	1	1	1	1
하이드록시에틸리덴-1,1- 다이포스폰산, 테트라소듐 염 (솔루티아(Solutia)로부터)								
2 EO를 갖는 소듐 라우릴 에테르 설페이트	10	5	5	5	5	5	5	5
모노에탄올아민	3	3	3	3	3	3	3	3
C ₁₂₋₁₈ -지방산	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
프로필렌글리콜		6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
소듐 쿠멘설포네이트		2	2	2	2	2	2	2
효소, 염료, 안정제	+	+	+	+	+	+	+	+
약 2000 μm 직경을 갖는 마이크로캡슐	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
물	100까지							
유동 한계(Pas)	0.58	1.16	1.16	없음	없음	없음	있음	없음

다목적 알칼리 세제 조성물(다목적, 유리, 주방) 경질 표면 세정 세제 조성물				
조성물 [중량%]	E1	E2	E3	E4
지방 알코올 에톡실레이트 C12-7EO	1	3	5	0.5
알킬벤젠설피온산 Na 염	3	1	2	4
옥틸설페이트	3	2	2	2
탄산나트륨	1.5	0.5	1.0	1.5
시트르산	0.5	0.5	0.5	0.5
지방산	0.5	0.5	0.5	1.0
에탄올	5	3	5	3
향료	0.2	0.2	0.2	0.2
물	100까지	100까지	100까지	100까지

산성 세제 조성물(욕실, 화장실)				
조성물 [중량%]	E5	E6	E7	E8
지방 알코올 에테르설페이트 C12-2EO 소듐 염	2	3	5	2
에탄올	3	3	3	3
시트르산	3	10	3	10
증점제 잔탄겔잔(Kelzan) ASX-T		0.05		0.05
향료	0.1	0.1	0.1	0.1
물	100까지	100까지	100까지	100까지

[0341]

세정 폐이스트 조성물	
조성물 [중량%]	E9
C 12 지방 알코올 설레이트	20
C16-18 지방 알코올 에톡실레이트 25 EO	20
C 12-18 지방산 모노에탄올아미드	10
황산나트륨	40
탄산나트륨	5
셀룰로오스	4.899
염료	0.001
향료	0.1

[0342]

자가 밀포형(Self Foaming) 세정 분말 조성물	
조성물 [중량%]	E10
C 12 지방 알코올 설레이트	2
황산나트륨	37.899
탄산나트륨	25
시트르산	35
염료	0.001
향료	0.1

[0343]

유동 한계를 갖는 클리어 수성 세제 및 세정제의 조성						
성분	V1	E1	E2	E3	E4	E5
1,2 프로판 다이올	8	0	2	6	4	2
다이프로필렌 글리콜	0	8	6	2	4	2
폴리아크릴레이트(카보풀 아쿠아 30)	3	3	3	3	3	
폴리아크릴레이트(폴리겔(Polygel) W301)	-	-	-	-	-	1.8
7 EO를 갖는 C ₁₂₋₁₄ -지방 알코올	10	10	10	10	10	10
C ₉₋₁₃ -알킬렌센설포네이트, Na 염	10	10	10	10	10	-
시트르산	3	3	3	3	3	2
디퀘스트® 2010 하이드록시에틸리텐-1, 1-다이포스폰산, 테트라소듐 염 (솔루티아로부터)	1	1	1	1	1	-
디퀘스트® 2066 다이에틸렌 트라이아민 웬타(에틸렌포스폰산) 웬타 Na 염 (솔루티아로부터)	-	-	-	-	-	0.7
2 EO를 갖는 소듐 라우릴 에테르 설레이트	10	10	10	10	10	5
모노에탄올아민	3	3	3	3	3	2
C ₁₂₋₁₈ -지방산 Na 염	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5
효소, 염료, 안정제	+	+	+	+	+	+
약 2000 μm 직경을 갖는 마이크로캡슐	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
물	100 까지					
유동 한계 (Pas)	0.4	0.6	0.6	0.8	1.0	0.6
외관	혼탁	투명	투명	투명	투명	투명

[0344]

액체 세탁 세제	
성분	중량%
ABS (알킬렌센설포네이트)	10
FAEOS	5
C _{12/14} 7EO	10
C _{12/18} 지방산	5
글리세롤	5
소듐 시트레이트	3
프로테아제/아밀라제/셀룰라제	1
티노팔® DMS-X (시바(Ciba)에 의해 제조된 광학 증백제)	0.2
물	100까지

[0345]

과립 세탁 세제	
성분	중량%
ABS (알킬 벤젠설포네이트)	11
C _{13/15} 7EO	3
탄산나트륨	20
탄산수소나트륨	5
황산나트륨	25
규산나트륨	5
과탄산나트륨	13
TAED	5
소듐 폴리아크릴레이트	4.5
효소 (프로테아제, 아밀라제, 및 셀룰로오스)	3.5
물	100까지

[0346]

수성 액체 세척 제품 제형 (FWM1-무 함유 및 FWM2-함유 0.5% 하이퍼분지형 폴리에스테르아미드)		
제형	FWM1	FWM2
2 EO를 갖는 C ₁₂₋₁₄ -지방 알코올	5	5
LAS	10	10
7 EO를 갖는 C ₁₂₋₁₈ -지방 알코올	10	10
C ₁₂₋₁₈ 비누	8	8
시트레이트	4	4
1,2-프로판다이올	5	5
하이브란(Hybrane)® SIP 2100 (DSM에 의해 제조됨)		0.5

[0347]

세제 조성물	액체 세탁 세제 조성물		
	E1	E2	E3
7 EO를 갖는 C ₁₂₋₁₄ 지방 알코올	5	4	10
C ₉₋₁₃ 알킬 벤젠설포네이트, Na 염	10	10	10
2 EO를 갖는 소듐 라우릴 에테르설페이트	-	-	8
활성 물질 (특정 폴리카르보네이트-, 폴리우레탄-, 및/또는 폴리우레아폴리오르가노실록산 화합물, 또는 반응성 환형 카르보네이트 및 우레아 유형의 이의 전구 화합물)	1	1	1
폴리아크릴레이트 증점제	-	-	1
과탄산나트륨	15	18	-
TAED	3	3	-
C ₁₂₋₁₈ 지방산, Na 염	1	1.5	7.5
PVA/말레산 공중합체	4.5	2	-
시트르산, Na 염	2.5	-	2
포스폰산, Na 염	0.5	0.5	1
탄산나트륨	10	20	-
프로판다이올	-	-	6.5
제올라이드 A	25	25	-
봉산 소듐 염	-	-	1.2
실리콘 소포제	2.5	1.3	0.1
효소 (프로테아제, 아밀라제, 셀룰라제)	+	+	+
착색제	+	+	+
향료	0.5	0.2	0.8
물	-	-	100까지
황산나트륨	-	100까지	-
증탄산나트륨	100까지	-	-

[0348]

바람직한 포스페이트-무 함유 자동 식기세척제의 예시적 제형				
성분	제형 1(중량%)	제형 2(중량%)	제형 3(중량%)	제형 4(중량%)
시트레이트	5 내지 60	10 내지 55	15 내지 50	15 내지 50
과탄산나트륨	1 내지 20	2 내지 15	4 내지 10	4 내지 10
표백제 죽매	0.01 내지 3	0.02 내지 2	0.02 내지 2	0.02 내지 1
공중합체 ¹	0.1 내지 30	0.5 내지 25	1.0 내지 20	1.0 내지 20
비이온성 계면활성제 ²	1 내지 10	2 내지 8	2 내지 8	3 내지 6
기타	100까지	100까지	100까지	100까지

[0349]

바람직한 포스페이트-무함유 자동 식기세척제의 예시적 제형				
성분	제형 5(중량%)	제형 6(중량%)	제형 7(중량%)	제형 8(중량%)
시트레이트	5 내지 60	10 내지 55	15 내지 50	15 내지 50
과탄산나트륨	1 내지 20	2 내지 15	4 내지 10	4 내지 10
포스포네이트	2 내지 8	2 내지 8	2 내지 8	2 내지 8
공중합체 ¹	0.1 내지 30	0.5 내지 25	1.0 내지 20	1.0 내지 20
비이온성 계면활성제 ²	1 내지 10	2 내지 8	2 내지 8	3 내지 6
기타	100 까지	100 까지	100 까지	100 까지

바람직한 포스페이트-무함유 자동 식기세척제의 예시적 제형				
성분	제형 9(중량%)	제형 10(중량%)	제형 11(중량%)	제형 12(중량%)
시트레이트	5 내지 60	10 내지 55	15 내지 50	15 내지 50
과탄산나트륨	1 내지 20	2 내지 15	4 내지 10	4 내지 10
효소	0.1 내지 6	0.2 내지 5	0.4 내지 5	0.4 내지 5
공중합체 ¹	0.1 내지 30	0.5 내지 25	1.0 내지 20	1.0 내지 20
비이온성 계면활성제 ²	1 내지 10	2 내지 8	2 내지 8	3 내지 6
기타	100 까지	100 까지	100 까지	100 까지

바람직한 포스페이트-무함유 자동 식기세척제의 예시적 제형				
성분	제형 13(중량%)	제형 14(중량%)	제형 15(중량%)	제형 16(중량%)
시트레이트	5 내지 60	10 내지 55	15 내지 50	15 내지 50
카르보네이트/탄산수소염	2 내지 40	2 내지 40	2 내지 40	2 내지 40
실리케이트	0 내지 15	0 내지 15	0 내지 15	0.1 내지 10
포스포네이트	0 내지 14	0 내지 14	0 내지 14	2 내지 8
과탄산나트륨	1 내지 20	2 내지 15	4 내지 10	4 내지 10
표백제 촉매	0.01 내지 3	0.02 내지 2	0.02 내지 2	0.02 내지 1
공중합체 ¹	0.1 내지 30	0.5 내지 25	1.0 내지 20	1.0 내지 20
비이온성 계면활성제 ²	1 내지 10	2 내지 8	2 내지 8	3 내지 6
효소	0.1 내지 6	0.2 내지 5	0.4 내지 5	0.4 내지 5
기타	100 까지	100 까지	100 까지	100 까지

¹하기를 포함하는 공중합체:

i) 단일 또는 다중불포화 카르복실산의 기로부터의 단량체:

ii) 일반식 $R(R^2)C=C(R^3)-X-R^4$ (여기서, R^1 내지 R^3 은 상호 독립적으로 $-H$, $-CH_3$ 또는 $-C_2H_5$ 를 나타내고, X 는 $-CH_2-$, $C(O)O-$ 및 $-CO-$, $NH-$ 로부터 선택되는 선택적으로 존재하는 스페이서 기를 나타내고, R^4 는 2 내지 22개의 탄소 원자를 갖는 적체 또는 분자형 포화 알킬 잔기를 나타내거나 또는 6 내지 22개의 탄소 원자를 갖는 불포화, 비방직하게는 방향족 잔기를 나타냄)의 단량체

iii) 선택적으로 추가의 단량체

²일반식 $R'-CH(OH)CH_2-O-(AO)_w-(A''O)_x-(A'''O)_y-R_2$ (여기서, R^1 은 적체 또는 분자형, 포화 또는 단일- 또는 다중불포화 C6-24 알킬 또는 알케닐 잔기를 나타내고; R^2 는 2 내지 26개의 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분자형 단화수소 잔기를 나타내고; A, A', A'' 및 A'''는 상호 독립적으로 $--CH_2CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $--CH_2CH_2-CH(CH_3)$, $CH_2-CH_2-CH_2CH_2-$, $-CH_2-CH(CH_3)CH_2-$, $-CH_2-CH(CH_2-CH_3)$ 을 포함하는 군으로부터의 잔기를 나타내고, w, x, y 및 z는 0.5 내지 120 사이의 값을 나타내고, x, y 및 z는 또한 0일 수 있음)의 비이온성 계면활성제.

포스페이트-무함유 자동 식기세척 세제의 조성		
원료	V1	E1
시트레이트	23	23
MGDA	8	8
공중합체 ¹	12	12
HEDP	2	2
소다	28	28
과탄산나트륨	10	10
TAED	2.4	2.4
프로테아제	2	2
아밀라제	1.8	1.8
비이온성 계면활성제 ²	5	-
비이온성 계면활성제 ³	-	5
기타	100 까지	100 까지

[0351]

[0352]

직물 세척제	
성분	중량% 순수한 물질
잔탄	0.3-0.5
발포 방지제	0.2-0.4
글리세롤	6-7
에탄올	0.3-0.5
FAEOS	4-7
비이온성 계면활성제 (특히 FAEO, APG)	24-28
봉산	1
소듐 시트레이트 2수화물	1-2
소다	2-4
코코넛 지방산	14-16
HEDP	0.5
PVP	0-0.4
광학 증백제	0-0.05
염료	0-0.001
향료	0-2
탈염수	나머지

[0353]

성분	중량 퍼센트 (활성 %)				
	D1	D2	D3	D4	D5
소듐 도데실 벤조포네이트	26.09	17.30	15.60	17.70	16.70
소듐 알킬 C ₁₄₋₁₅ /7EO 에테르 설페이트	13.80	-	-	-	-
선형 알코올 에톡실레이트 C ₁₄₋₁₅ /7EO	13.44	5.4	14.6	5.5	5.2
폴리에틸렌 글리콜 PEG 75	2	1.4	1.3	1.4	1.4
폴리옥시에틸렌 (100) 스테아릴 에테르	21.99	15.6	14.1	15.9	15.1
규산나트륨 SiO ₂ /Na ₂ O 비 1.6-1.8	3.72	16.6	15	17	16
규산나트륨 (브리테실(Britesil) @ C24)	7	-	-	-	-
탄산나트륨	-	6.5	5.9	6.7	6.3
사봉산나트륨 10수화물	-	11.9	10.8	12.2	11.5
소듐 폴리아크릴레이트 ~4500 MW	-	1.8	1.7	-	5.2
EDTA-테트라소듐 염	-	0.1	0.1	0.1	0.1
광학 증백제 (티노팔 @ CBS-X)	0.15	0.1	0.09	0.1	0.1
염료 및 방향제	0.9	0.9	0.81	1.01	0.91
물	10.92	22.10	19.90	22.4	21.5

[0354]

성분	중량 퍼센트 (활성 %)				
	FS1	FS2	FS3	FS4	FS5
다이-(수소화 탤로우) 다이메틸 암모늄 메틸 설페이트	33.6	33.2	44.4	22.2	33.2
불포화 트라이알킬글리세라이드	16.8	16.6	22.2	11.1	16.6
수소화 탤로우 지방산	16.8	16.6	22.2	11.1	16.6
C ₁₂₋₁₈ 코코 지방산	11.2	11.1	-	11.1	-
C ₁₂₋₁₈ 지방 알코올 에톡실레이트 (7EO)	11.2	11.1	-	-	16.6
방향 오일	10.4	11.4	11.2	11.2	17

[0355]

성분	예시적인 자동 식기세척제			
	제형 1	제형 2	제형 3	제형 4
시트레이트	12-50	15-40	12-50	15-40
다이카르복실산	1-18	1-18	2-16	4-12
포스페이트	-	-	-	-
표백제	-	-	-	-
기타	100 까지	100 까지	100 까지	100 까지

[0356]

성분	추가적인 예시적인 자동 식기세척제			
	제형 1	제형 2	제형 3	제형 4
시트레이트	12-50	15-40	12-50	15-40
다이카르복실산	1-18	1-18	2-16	4-16
카르보네이트	5-50	10-40	5-50	10-40
포스페이트	-	-	-	-
표백제	-	-	-	-
기타	100 까지	100 까지	100 까지	100 까지

[0357]

성분	추가적인 예시적인 자동 식기세척제			
	중량%			
	제형 1	제형 2	제형 3	제형 4
시트레이트	12-50	15-40	12-50	15-40
다이카르복실산	1-18	1-18	2-16	4-12
카르보네이트	5-50	10-30	5-50	10-30
포스포네이트	1-8	1-8	1.2-6	1.2-6
포스페이트	-	-	-	-
표백제	-	-	-	-
기타	100 까지	100 까지	100 까지	100 까지

[0358]

성분	바람직한 자동 식기세척제			
	중량%			
	제형 1	제형 2	제형 3	제형 4
시트레이트	12-50	15-40	12-50	15-40
다이카르복실산	1-18	1-18	2-16	4-12
카르보네이트	0-50	0-30	0-30	0-30
포스포네이트	0-8	0-8	0-8	0-8
포스페이트	-	-	-	-
표백제	-	-	-	-
기타	100 까지	100 까지	100 까지	100 까지

[0359]

성분	추가적인 바람직한 자동 식기세척제			
	중량%			
	제형 1	제형 2	제형 3	제형 4
시트레이트	12-50	15-40	12-50	15-40
밀레산	1-18	1-18	2-16	4-12
카르보네이트	5-50	10-30	5-50	10-30
포스포네이트	1-8	1-8	1.2-6	1.2-6
포스페이트	-	-	-	-
표백제	-	-	-	-
기타	100 까지	100 까지	100 까지	100 까지

[0360]

성분	바람직한 자동 식기세척제			
	중량%			
	제형 1	제형 2	제형 3	제형 4
시트레이트	12-50	15-40	12-50	15-40
다이카르복실산	1-18	1-18	2-16	4-12
카르보네이트	0-50	0-30	0-30	0-30
포스포네이트	0-8	0-8	0-8	0-8
비이온성 계면활성제	0.1-15	0.1-15	0.5-8	0.5-8
포스페이트	-	-	-	-
표백제	-	-	-	-
기타	100 까지	100 까지	100 까지	100 까지

[0361]

성분	추가적인 바람직한 자동 식기세척제			
	중량%			
	제형 1	제형 2	제형 3	제형 4
시트레이트	12-50	15-40	12-50	15-40
밀레산	1-18	1-18	2-16	4-12
카르보네이트	5-50	10-30	5-50	10-30
포스포네이트	1-8	1-8	1.2-6	1.2-6
비이온성 계면활성제	0.1-15	0.1-15	0.5-8	0.5-8
포스페이트	-	-	-	-
표백제	-	-	-	-
기타	100 까지	100 까지	100 까지	100 까지

[0362]

성분	비람직한 자동 식기세척제			
	중량%			
	제형 1	제형 2	제형 3	제형 4
시트레이트	12-50	15-40	12-50	15-40
다이카르복실산	1-18	1-18	2-16	4-12
카르보네이트	0-50	0-30	0-30	0-30
포스포네이트	0-8	0-8	0-8	0-8
설포 공중합체	0-20	0-20	0-20	0-20
비이온성 계면활성제	0-15	0-15	0-8	0-8
효소 제제	0.1-12	0.1-12	0.5-8	0.5-8
포스페이트	-	-	-	-
표백제	-	-	-	-
기타	100 까지	100 까지	100 까지	100 까지

[0363]

성분	추가적인 바람직한 자동 식기세척제			
	중량%			
	제형 1	제형 2	제형 3	제형 4
시트레이트	12-50	15-40	12-50	15-40
밀레산	1-18	1-18	2-16	4-12
카르보네이트	5-50	10-30	5-50	10-30
포스포네이트	1-8	1-8	1.2-6	1.2-6
설포 공중합체	0-20	0-20	0-20	0-20
비이온성 계면활성제	0.1-15	0.1-15	0.5-8	0.5-8
효소 제제	0.1-12	0.1-12	0.5-8	0.5-8
포스페이트	-	-	-	-
표백제	-	-	-	-
기타	100 까지	100 까지	100 까지	100 까지

[0364]

성분	바람직한 자동 식기세척제			
	중량%			
	제형 1	제형 2	제형 3	제형 4
시트레이트	12-50	15-40	12-50	15-40
다이카르복실산	1-18	1-18	2-16	4-12
카르보네이트	0-50	0-30	0-30	0-30
포스포네이트	0-8	0-8	0-8	0-8
설포 공중합체	0-20	0-20	0-20	0-20
비이온성 계면활성제	0-15	0-15	0-8	0-8
효소 제제	0-12	0-12	0-8	0-8
유기 용매	0.1-15	0.5-8	0.1-15	0.5-8
포스페이트	-	-	-	-
표백제	-	-	-	-
기타	100 까지	100 까지	100 까지	100 까지

[0365]

성분	추가적인 바람직한 자동 식기세척제			
	중량%			
	제형 1	제형 2	제형 3	제형 4
시트레이트	12-50	15-40	12-50	15-40
다이카르복실산	1-18	1-18	2-16	4-12
카르보네이트	5-50	10-30	5-50	10-30
포스포네이트	1-8	1-8	1.2-6	1.2-6
설포 공중합체	0-20	0-20	0-20	0-20
비이온성 계면활성제	0.1-15	0.1-15	0.5-8	0.5-8
효소 제제	0.1-12	0.1-12	0.5-8	0.5-8
유기 용매	0.1-15	0.5-8	0.1-15	0.5-8
포스페이트	-	-	-	-
표백제	-	-	-	-
기타	100 까지	100 까지	100 까지	100 까지

[0366]

자동 식기세척제		
성분	중량%	
	C 1	E 1
소듐 시트레이트	9	9
수산화칼륨	7	7
탄산나트륨	14	14
말레산	-	1
설포 중합체	4.2	4.2
HEDP	1.5	1.5
비이온성 계면활성제	2	2
프로테아제 제제	2	2
아밀라제 제제	0.8	0.8
알칸올아민	1.5	1.5
증점제	2	2
물, 기타	100 까지	100 까지

[0367]

성분	수동 식기세척제						
	중량%						
	발명 1	발명 2	발명 3	발명 4	발명 5	발명 6	발명 7
지방 알코올 에테르 설페이트	10	13.33	12	12	13.3	13.3	13.3
코카미도프로필베타인	2.5	3.33	3.1	3.1	3	3	3
Scs. 알간설포네이트	2.5	3.33	2.9	2.9	3.7	3.7	3.7
지방 알코올 에톡실레이트	9	6	-	-	-	-	-
염화나트륨	24	24	22	24	20	24	20
에탄올	-	-	2	2	2.5	2.5	4
향료	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
착색제	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
물	51.60	49.51	57.5	55.5	57	53	55.5

[0368]

성분	항박테리아 활성 세제/세정제					
	V1	E1	E2	E3	E4	E5
7EO를 갖는 C ₁₂₋₁₈ 지방 알코올	12	12	12	5	5	-
N-코코알킬N,N 다이메틸아민 옥사이드	1.95	1.95	1.95	2	2	-
에스터콰트(Esterquat) (N-메틸-N-(2-하이드록시에틸)-N-N-(다이엘로우아실옥시에틸)암모늄 메토설페이트	-	-	-	-	-	15
AgNO ₃ ·H ₂ O	0.0043	0.0043	0.0043	0.004	0.004	0.004
C14 지방산	5	5	-	-	-	-
파르네솔	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
코코 지방산	2.5	2.5	2.5	12	-	-
시트르산	-	-	-	1.0	0.1	-
H ₂ O ₂	-	0.5	0.035	2	5	0.5
NaOH	0.35	0.35	0.35	1.9	-	-
NH ₄ OH	0.04	0.04	0.04	0.06	-	-
2-프로판올	-	-	-	-	-	1.67
MgCl ₂ x 6H ₂ O	-	-	-	-	-	0.01
향료 A	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.75
물	100 까지	100 까지	100 까지	100 까지	100 까지	100 까지
pH	8.5	8.5	8.5	8.5	5.5	2.6

[0369]

성분	항-그레이제(anti-grey agent)를 함유하는 세제	
		M1 (중량%)
C ₉₋₁₃ 알킬벤젠설포네이트 소듐 염		10
2EO를 갖는 소듐 라우릴 에테르 설페이트		5
7EO를 갖는 C ₁₂₋₁₈ 지방 알코올		10
C ₁₂₋₁₄ 알킬 폴리글리코사이드		2
C ₁₂₋₁₈ 지방산 소듐 염		8
글리세롤		5
트라이소듐 시트레이트		1
폴리아크릴레이트		2
활성 성분 (항-그레이제-폴리카르보네이트-, 폴리우레탄-, 및/또는 폴리우레아-폴리오르가노실록산 화합물 또는 이의 제조에 사용되는 전구 화합물)		1
효소, 향료, 광학 증백제		+
물		100까지

[0370]

성분	기재에 적용하기 위한 예시적 세제 조성물				
	D1	D2	D3	D4	D5
소듐 도데실 벤젠 설포네이트	26.09	17.30	15.60	17.70	27.00
소듐 알킬 $C_{14-15}/7EO$ 에테르 설페이트	13.80				14.00
선형 알코올 에톡실레이트 $C_{14-15}/7EO$	13.44	5.40	14.60	5.50	14.00
선형 알코올 에톡실레이트 $C_{12-20}/7EO$					23.00
폴리에틸렌 글리콜 PEG-75	2.00	1.40	1.30	1.40	2.00
폴리옥시에틸렌 (100) 스테아릴 에테르	21.99	15.60	14.10	15.90	
규산나트륨 SiO_2/Na_2O 비 1.6-1.8	3.72	16.60	15.00	17.00	
규산나트륨 (브리테실® C24)	7.00				11.00
탄산나트륨		6.50	5.90	6.70	
사봉산나트륨 10 수화물		11.90	10.80	12.20	
소듐 폴리아크릴레이트 -4,500 MW		1.80	1.70		
EDTA - 테트라소듐 염		0.10	0.10	0.10	
광학 증백제 (티노팔® CBS-X)	0.15	0.10	0.09	0.10	0.20
염료 및 방향제	0.90	0.90	0.81	1.01	0.35
물	10.92	22.10	19.90	22.40	9.55

[0371]

성분	기재에 적용하기 위한 예시적인 효소 함유 조성물				
	E1	E2	E3	E4	E5
폴리에틸렌 글리콜 PEG-75	98.60	99.10			
지방산 기반 매트릭스 1			98.9		99.10
지방산 기반 매트릭스 2				98.80	
프로테아제	0.10	0.10	0.12	0.10	0.10
만나나제	0.02		0.02	0.02	
아밀라제	0.12	0.25	0.1	0.12	0.25
셀룰라제	0.08		0.1	0.08	
리파제	0.08			0.08	
펩타이드 리아제				0.05	
효소 안정제	1.00	0.55	0.75	0.75	0.55

[0372]

지방산 기반 매트릭스 1은 코코넛 지방산의 소듐 염 20 중량%, 비중합체성 폴리올 (소르비톨, 글리세린, 프로필렌 글리콜, 수크로스 및 글루코스) 50 중량%, 음이온성 및 비이온성 계면활성제 15 중량%, 및 물 15 중량%를 포함함.

[0374]

지방산 기반 매트릭스 2는 스테아르산의 소듐 염 20 중량%, 라우르산의 소듐 염 3 중량%, 미리스트산의 소듐 염 3 중량%, 비중합체성 폴리올 50 중량% (소르비톨, 글리세린, 및 프로필렌 글리콜), 라우르산 2 중량%, 스테아르산 2 중량%, 음이온성 계면활성제 10 중량%, 및 물 10 중량%를 포함함.

[0375]

[표 1]

세제 조성물	성분	(중량%)
비누 (포화 C_{12-24} 지방산 비누 및 올레산 비누)	5.42	
소듐 C_{12-14} 알킬 벤젠설포네이트	22.67	
소듐 C_{14-16} 지방 알코올 설페이트	4.59	
C_{12-15} 지방 알코올 .5EO	0.81	
탄산나트륨	4.55	
제올라이트 A	29.86	
규산나트륨	8.00	
아크릴산/랄레산 공중합체	16.16	
광학 증백제	0.45	
포스포네이트	2.30	
NaOH, 50%	0.63	
물	3.88	
기타 염	0.68	

[0376]

[0377]

성분	(중량%)
세제 조성물	59.5%
코팅된 표백제 (과탄산나트륨)	23.3%
코팅된 표백 활성제 (TAED)	7%
시트르산 1 수화물	10.2%

[0378]

미립자 세제 조성물	
성분	중량%
소듐 도데실벤젠설포네이트	8.5
7 불의 에틸렌 옥사이드와 축합된, c12-C15 1 차 알코올	4
나트륨-경화된 평지씨유 비누	1.5
삼인산나트륨	33
탄산나트륨	5
규산나트륨	6
황산나트륨	20
물	9
영광제, 오염물-현탁제(soil-suspending agent), 염료, 향료	미량
과봉산나트륨	12
테트라아세틸 에틸렌 다이아민 (TAED) (과립)	2
단백질 분해 효소 (노보(Novo)로부터의 사비나제)	0.4

[0379]

세제 조성물 A
9 % 음이온성 세제
1 % 비이온성 세제
21.5 % 소듐 트라이폴리포스페이트
7 % 과봉산나트륨
0.6 % 사비나제 (단백질 분해 효소)
나머지 황산나트륨 + 미량 성분

[0380]

세제 조성물 B
9 % 음이온성 세제
4 % 비이온성 세제
28% 제올라이트
4.5% 니트릴로트라이아세테이트
5.5% 과봉산나트륨
3.5% 테트라아세틸에틸렌다이아민
0.5% 사비나제
나머지 황산나트륨 + 미량 성분

[0381]

세제 조성물 C
5 % 음이온성 세제
4 % 비이온성 세제
1 % 비누
30 % 제올라이트
3. %, 아크릴산과 말레산무수물의 공중합체
7.5% 과봉산나트륨
3 % 테트라아세틸에틸렌다이아민
나머지 황산나트륨 + 미량 성분

[0382]

세제 조성물 D
8 % 음이온성 합성 세제
4 % 비이온성 합성 세제
4 % 비누
35. % 탄산나트륨
20 % 분말 칼사이트
6 % 과봉산나트륨
2 % 테트라아세틸에틸렌다이아민
0.5% 사비나제
나머지 황산나트륨 + 미량 성분

[0383]

세탁 세제 조성물	
성분	중량부
소듐 도데실 벤젠 설포네이트	8.5
7 불의 에틸렌 옥사이드와 축합된, C12-C15 1 차 알코올	4
나트륨-경화된 평지씨유 비누	1.5
산인산나트륨	33
탄산나트륨	5
규산나트륨	6
황산나트륨	20
물	9
형광제, 오염물-현탁제, 염료, 향료	미량
과봉산나트륨	12
테트라아세틸 에틸렌 다이아민 (TAED) (과립)	2
단백질 가수분해 효소 (노보로부티의 사비나제)	0.4

[0384]

세탁 세제 조성물		A	B	C	D
소듐 도데실 벤젠 설포네이트	9	9	9	9	9
7 불의 에틸렌 옥사이드와 축합된, C13-C15 선형 1 차 알코올 (예를 들어, 신페로닉(Synperonic) A7)	1	4	4	1	
3 불의 에틸렌 옥사이드와 축합된, C13-C15 선형 1 차 알코올 (예를 들어, 신페로닉 A3)	3	0	0	3	
소듐 트라이폴리포스페이트	23	23	0	0	
제올라이트 유형 4A	0	0	24	24	
아크릴산과 말레산 무수물의 공중합체			4	4	
소듐 폴리아크릴레이트	2	2	0	0	
알칼리 실리케이트	5	5			
형광제	0.25	0.25	0.16	0.16	
EDTA	0.15	0.15	0.18	0.18	
SCMC	0.5	0.5	0.55	0.55	
염	2	2			
황산나트륨	26.8	26.8	22.31	22.31	
탄산나트륨	0	0	10.3	10.3	
수분	10	10	11	11	
TAED	3	3	3.3	3.3	
과봉산나트륨 1 수화물	10	10	8	8	
칼슘 디퀘스트 [®] 2047	0.7	0.7	0.3	0.3	
폼 억제제	3	3	2.5	2.5	
향료	0.2	0.2	0	0	
알칼리 프로테아제 (사비) 나제 (A) 6T	0.4	0.4	0.4	0.4	

[0385]

세제 조성물				
성분	실시 예 1	실시 예 2	실시 예 3	실시 예 4
제료	수준(있는 그대로의 부)	수준(있는 그대로의 부)	수준(있는 그대로의 부)	수준(있는 그대로의 부)
글리세롤	3.17	3.17	3.17	3.17
MPG	5.7	5.7	5.7	5.7
NaOH	2.13	2.13	2.13	2.13
TEA	2.05	2.05	2.05	2.05
네오돌 25-7	12.74	12.74	12.74	12.74
F-염료	0.18	0.18	0.18	0.18
시트르산	1.71	1.71	1.71	1.71
LAS (LAS 산으로서)	8.49	8.49	8.49	8.49
지방산	3.03	3.03	3.03	3.03
엠피겐(Empigen) BB	1.5	1.5	1.5	1.5
SLES	4.24	4.24	4.24	4.24
디퀘스트 2066	0.875	0.875	0.875	0.875
페이던트 블루(Patent Blue)	0.00036	0.00036	0.00036	0.00036
애씨드 엘로우(Acid Yellow)	0.00005	0.00005	0.00005	0.00005
유탁제	0.0512	0.0512	0.0512	0.0512
향료	0.734	0.734	0.734	0.734
봉사	10	10	10	10
사비나제	2.362	2.362	2.362	2.362
스테인자임(Stainzyme)	0.945	0.945	0.945	0.945
비누	3.03	3.03	3.03	3.03
(니폰 쇼쿠바이)(Nippon Shokubai)로부터의) EPEI 20E0: 중량 평균 분자량이 약 600 이고, 평균 20 개의 에틸렌 옥사이드 부분과의 알록실화에 의해 변형된 폴리에틸렌이민	5.5	5.5	5.5	9
리펙스(Lipex)®(노보자임스로부터) (클라리언트로부터의) 텍스케어 SRN170 방오 중합체	3	3	3	3
(바스프(BASF)로부터의) 소콜란(Sokolan) CP5 방오 중합체	0	0	20	0

[0386]

상기에 나타난 바와 같이, 본 발명의 세정 조성물은 임의의 적합한 형태로 제형화되고 조제자에 의해 선택되는 임의의 프로세스로 제조되는데, 이에 대한 비제한적인 예들이 미국 특허 제5,879,584호, 제5,691,297호, 제5,574,005호, 제5,569,645호, 제5,516,448호, 제5,489,392호, 및 제5,486,303호에 기재되어 있으며, 이들 모두는 본 명세서에 참고로 포함된다. 낮은 pH 세정 조성물이 바람직한 일부 실시 형태에서, 그러한 조성물의 pH는 HCl과 같은 산성 물질의 첨가를 통해 조절된다.

[0388]

본 명세서에 개시된 세정 조성물은 일정 부위 (예를 들어, 표면, 물품, 식기류, 또는 패브릭)를 세정하는 데 사용된다. 전형적으로, 부위의 적어도 일부분은 순수한(neat) 형태의 또는 세척액에 회석된 본 발명의 세정 조성물의 실시 형태와 접촉되고, 이어서 상기 부위는 선택적으로 세척되고/되거나 헹궈진다. 본 발명의 목적상, "세척"은 스크러빙(scrubbing), 및 기계적 교반을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 전형적으로 용액 중 약 500 ppm 내지 약 15,000 ppm의 농도로 이용된다. 세척 용매가 물인 경우, 수온은 전형적으로 약 5°C 내지 약 90°C 범위이고, 부위가 패브릭을 포함하는 경우, 물 대 패브릭의 질량비는 전형적으로 약 1:1 내지 약 30:1이다.

[0389]

세정 조성물을 제조하고 사용하는 프로세스

[0390]

본 발명의 세정 조성물은 임의의 적합한 형태로 제형화되고 조제자에 의해 선택되는 임의의 적합한 프로세스로 제조된다 (예를 들어, 미국 특허 제5,879,584호, 제5,691,297호, 제5,574,005호, 제5,569,645호, 제5,565,422호, 제5,516,448호, 제5,489,392호, 제5,486,303호, 제4,515,705호, 제4,537,706호, 제4,515,707호, 제4,550,862호, 제4,561,998호, 제4,597,898호, 제4,968,451호, 제5,565,145호, 제5,929,022호, 제6,294,514호 및 제6,376,445호 참조).

[0391]

일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 정제, 캡슐, 사쉐(sachet), 파우치, 및 다중-구획 파우치를 포함하는 단위 투여량 형태로 제공된다. 일부 실시 형태에서, 단위 투여량 포맷은 다중-구획 파우치 (또는 기타 단위 투여량 포맷) 내 성분들의 제어된 방출을 제공하도록 설계된다. 적합한 단위 투여량 포맷 및 제어된 방출 포맷은 본 기술 분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 유럽 특허 EP 2 100 949호, 국제특허 공개 WO 02/102955호, 미국 특허 제4,765,916호 및 제4,972,017호, 및 단위 투여량 포맷 및 제어된 방출 포맷으로 사용하기에 적합한 물질에 대한 국제특허 공개 WO 04/111178호 참조). 일부 실시 형태에서, 단위 투여량 형태는 수용성 필름 또는

수용성 파우치로 둘러싸인 정제로 제공된다. 단위 투여량을 위한 다양한 포맷이 EP 2 100 947호에서 제공되고, 본 기술 분야에 공지되어 있다.

사용 방법

[0392] 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 표면 (예를 들어, 식기류), 세탁물, 경질 표면, 콘택트 렌즈 등을 세정하는데 사용된다. 일부 실시 형태에서, 표면의 적어도 일부분은, 순수한 형태의 또는 세척액에 희석된 본 발명의 세정 조성물의 적어도 하나의 실시 형태와 접촉되고, 이어서 상기 표면은 선택적으로 세척되고/되거나 행구진다. 본 발명의 목적상, "세척"은 스크러빙, 및 기계적 세척을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 본 발명의 세정 조성물은 용액 중에 약 500 ppm 내지 약 15,000 ppm의 농도로 사용된다. 세척 용매가 물인 일부 실시 형태에서, 수온은 전형적으로 약 5°C 내지 약 90°C 범위이다.

[0394] 본 발명은 세정을 필요로 하는 물품 또는 표면 (예를 들어, 경질 표면)을 세정 또는 세척하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 식기류 물품, 식탁용 식기류 물품, 패브릭 물품, 세탁 물품, 개인 케어 용품 등을 세정 또는 세척하는 방법, 및 경질 또는 연질 표면 (예를 들어, 물품의 경질 표면)을 세정 또는 세척하는 방법을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0395] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 세정을 필요로 하는 물품, 대상물, 또는 표면을 세정하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 물품 또는 표면 (또는 세정하고자 하는 물품 또는 표면의 일부분)을, 원하는 정도로 물품, 대상물 또는 표면을 세정하기에 충분한 시간 동안 및/또는 적합하고/하거나 효과적인 조건 하에서, 본 발명의 적어도 하나의 변이체 써몰리신 프로테아제 또는 본 발명의 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 그러한 방법은 물품, 대상물, 또는 표면을 물로 행구는 단계를 추가로 포함한다. 일부 그러한 방법에 대해, 세정 조성물은 식기세척 세제 조성물이고, 세정될 물품 또는 대상물은 식기류 물품 또는 식탁용 식기류 물품이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "식기류 물품"은 음식을 서빙하거나 먹는데 일반적으로 사용되는 물품이다. 식기류 물품은, 예를 들어, 접시, 플레이트(plate), 컵, 보울(bowl) 등일 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "식탁용 식기류"는 예를 들어, 접시, 날붙이류(cutlery), 나이프, 포크, 스푼, 젓가락, 유리제품, 피처(pitcher), 소스 그릇(sauce boat), 음료 용기, 서빙 물품 등을 포함하지만 이에 한정되지 않은 광범위한 용어이다. "식탁용 식기류 물품"은 음식을 서빙하거나 먹기 위한 이러한 또는 유사한 물품들 중 임의의 것을 포함한다. 일부 그러한 방법에 대해, 세정 조성물은 자동 식기세척 세제 조성물 또는 손 식기세척 세제 조성물이고, 세정될 물품 또는 대상물은 식기류 또는 식탁용 식기류 물품이다. 일부 그러한 방법에 대해, 세정 조성물은 세탁 세제 조성물 (예를 들어, 분말 세탁 세제 조성물 또는 액체 세탁 세제 조성물)이고, 세정될 물품은 패브릭 물품이다. 일부 다른 실시 형태에서, 세정 조성물은 세탁 전처리 조성물이다.

[0396] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 각각 세정 또는 세척을 필요로 하는 패브릭 물품을 선택적으로 세정 또는 세척하는 방법을 제공한다. 일부 실시 형태에서, 본 방법은, 패브릭 또는 세탁 세정 조성물을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 변이체 프로테아제를 포함하는 조성물, 및 세정을 필요로 하는 패브릭 물품 또는 세탁 물품을 제공하는 단계, 및 패브릭 또는 세탁 물품을 원하는 정도로 세정 또는 세척하기에 충분하거나 효과적인 조건 하에서 패브릭 물품 또는 세탁 물품 (또는 세정하고자 하는 물품의 일부분)을 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0397] 일부 실시 형태에서, 본 발명은 세정을 필요로 하는 물품 또는 표면 (예를 들어, 경질 표면)을 선택적으로 세정 또는 세척하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 세정 또는 세척될 물품 또는 표면을 제공하는 단계, 및 물품 또는 표면을, 원하는 정도로 세정 또는 세척하기에 충분한 시간 동안 및/또는 충분하거나 효과적인 조건 하에서 물품 또는 표면 (또는 세정 또는 세척하고자 하는 물품 또는 표면의 일부분)을 본 발명의 적어도 하나의 써몰리신 변이체 또는 적어도 하나의 그러한 써몰리신 변이체를 포함하는 본 발명의 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 그러한 조성물은, 예를 들어, 본 발명의 세정 조성물 또는 세제 조성물 (예를 들어, 손 식기세척 세제 조성물, 손 식기세척 세정 조성물, 세탁 세제 또는 패브릭 세제 또는 세탁물 또는 패브릭 세정 조성물, 액체 세탁 세제, 액체 세탁 세정 조성물, 분말 세탁 세제 조성물, 분말 세탁 세정 조성물, 자동 식기세척 세제 조성물, 세탁 부스터 세정 또는 세제 조성물, 세탁 세정 첨가제, 및 세탁 예비-얼룩빼기 조성물 등)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 본 방법은, 특히 추가 세정 또는 세척이 요구되는 경우, 1회 이상 반복된다. 예를 들어, 일부 경우에, 본 방법은 선택적으로 물품 또는 표면을 원하는 정도로 세정 또는 세척하기에 충분하거나 효과적인 시간 동안 물품 또는 표면을 적어도 하나의 변이체 프로테아제 또는 조성물과 접촉한 채로 두는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 방법은 물품 또는 표면을 물 및/또는 다른 액체로 행구는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 방법은 물품 또는 표면을 본 발명의 적어도 하나의 변이체

체 프로테아제 또는 본 발명의 조성물과 다시 접촉시키는 단계, 및 물품 또는 표면을 원하는 정도로 세정 또는 세척하기에 충분한 시간 동안 물품 또는 표면을 적어도 하나의 변이체 프로테아제 또는 조성물과 접촉한 채로 두는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 식기세척 세제 조성물이고, 세정될 물품은 식기류 또는 식탁용 식기류 물품이다. 본 발명의 방법의 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 자동 식기세척 세제 조성물 또는 손 식기세척 세제 조성물이고, 세정될 물품은 식기류 또는 식탁용 식기류 물품이다. 본 방법의 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 세탁 세제 조성물이고, 세정될 물품은 패브릭 물품이다.

[0398] 본 발명은 자동 식기세척기에서 식탁용 식기류 또는 식기류 물품을 세정하는 방법을 또한 제공하는데, 상기 방법은 자동 식기세척기를 제공하는 단계, 본 발명의 적어도 하나의 써몰리신 변이체를 포함하는 자동 식기세척 조성물 또는 본 발명의 조성물을 식탁용 식기류 또는 식기류 물품을 세정하기에 충분한 양으로 식기세척기에 (예를 들어, 조성물을 식기세척기 내의 적절한 또는 제공되는 세제 구획 또는 디스펜서에 넣음으로써) 넣는 단계, 식기류 또는 식탁용 식기류 물품을 식기세척기 내에 두는 단계, 및 (예를 들어, 제조사의 사용 설명에 따라) 식기세척기를 작동시켜 식탁용 식기류 또는 식기류 물품을 세정하는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 방법은 본 명세서에서 제공되는 적어도 하나의 써몰리신 변이체를 포함하지만 이에 한정되지 않는, 본 명세서에 기재된 임의의 자동 식기세척 조성물을 포함한다. 사용되는 자동 식기세척 조성물의 양은 제조사의 사용 설명 또는 제안에 따라 용이하게 결정될 수 있고, 본 명세서에 기재된 임의의 것을 포함하는 본 발명의 적어도 하나의 변이체 프로테아제를 포함하는 자동 식기세척 조성물의 임의의 형태 (예를 들어, 액체, 분말, 고체, 겔, 정제 등)가 사용될 수 있다.

[0399] 본 발명은 선택적으로 세정을 필요로 하는 표면, 물품 또는 대상물을 세정하는 방법을 또한 제공하는데, 상기 방법은 물품 또는 표면을 원하는 정도로 세정 또는 세척하기에 충분한 시간 동안 및/또는 충분하거나 효과적인 조건 하에서 물품 또는 표면 (또는 세정하고자 하는 물품 또는 표면의 일부분)을 순수한 형태의 또는 세척액에 희석된 본 발명의 적어도 하나의 변이체 써몰리신 또는 본 발명의 세정 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 이어서, 원한다면, 표면, 물품, 또는 대상물은 (선택적으로) 세척되고/되거나 행궈질 수 있다. 본 발명의 목적상, "세척"은, 예를 들어, 스크러빙 및 기계적 교반을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 세정 조성물은 용액 (예를 들어, 수용액) 중 약 500 ppm 내지 약 15,000 ppm의 농도로 사용된다. 세척 용매가 물인 경우, 수온은 전형적으로 약 5°C 내지 약 90°C 범위이고, 표면, 물품 또는 대상물이 패브릭을 포함하는 경우, 물 대 패브릭의 질량비는 전형적으로 약 1:1 내지 약 30:1이다.

[0400] 본 발명은 세탁기에서 세탁물 또는 패브릭 물품을 세정하는 방법을 또한 제공하는데, 상기 방법은 세탁기를 제공하는 단계, 본 발명의 적어도 하나의 변이체 써몰리신을 포함하는 세탁 세제 조성물을 세탁물 또는 패브릭 물품을 세정하기에 충분한 양으로 세탁기에 (예를 들어, 조성물을 세탁기의 적절한 또는 제공되는 세제 구획 또는 디스펜서에 넣음으로써) 넣는 단계, 세탁물 또는 패브릭 물품을 세탁기에 넣는 단계, 및 (예를 들어, 제조사의 사용 설명에 따라) 세탁기를 작동시켜 세탁물 또는 패브릭 물품을 세정하는 단계를 포함한다. 본 발명의 방법은 본 명세서에서 제공되는 적어도 하나의 임의의 변이체 써몰리신을 포함하지만 이에 한정되지 않는, 본 명세서에 기재된 임의의 세탁 세척 세제 조성물을 포함한다. 사용되는 세탁 세제 조성물의 양은 제조사의 사용 설명 또는 제안에 따라 용이하게 결정될 수 있고, 본 명세서에 기재된 임의의 것을 포함하는 본 발명의 적어도 하나의 변이체 프로테아제를 포함하는 세탁 세제 조성물의 임의의 형태 (예를 들어, 고체, 분말, 액체, 정제, 겔 등)가 사용될 수 있다.

0401] 실험

0402] 실시예 1

0403] 검정법

[0404] 하기 검정법이 하기에 기재된 실시예에서 사용되는 표준 검정법이다. 종종, 특정 프로토콜은 이를 표준 검정법으로부터의 변형을 필요로 한다. 이들 경우에, 하기의 이러한 표준 검정 프로토콜로부터의 변형이 실시예에서 확인된다.

0405] A. 성능 지수

[0406] 성능 지수(PI)는 동일 단백질 농도에서 변이체의 성능(측정된 값)과 표준 효소의 성능(이론적 값)을 비교한다. 또한, 이론적 값은 표준 효소의 랭뮤어(Langmuir) 방정식의 파라미터를 사용하여 계산될 수 있다.

[0407] 1 초과의 성능 지수(PI)(PI>1)는 표준 (예를 들어, 써몰리신)과 비교할 때 변이체에 의해 개선된 성능을 나타내는 한편, 1의 PI (PI=1)는 표준과 동일한 성능을 갖는 변이체를 나타내고, 1 미만의 PI(PI<1)는 표준보다 나쁜

성능을 갖는 변이체를 나타낸다.

B.96-웰 마이크로티터 플레이트(Microtiter Plate)에서의 Abz-AGLA-Nba 프로테아제 검정법

써몰리신 메탈로프로테아제 및 써몰리신 메탈로프로테아제 변이체의 프로테아제 활성을 결정하기 위하여, 2-아미노벤조일-L-알라닐글리실-L-류실-L-알라니노-4-니트로벤질아미드 (Abz-AGLA-Nba)의 가수분해를 측정한다.

사용된 시약 용액은 다음과 같다:

i) MES 완충제 (NaOH를 사용하여 pH 6.5로 조절되며, 2.6 mM CaCl₂ 및 0.00526% (v/v) 트윈(TWEEN)®-80을 함유하는, 52.6 mM MES);

ii) 광으로부터 차단된 실온에서 유지된 Abz-AGLA-Nba 스톡 용액 (DMF 중 48 mM Abz-AGLA-Nba);

iii) 프로필렌 글리콜을 갖는 효소 희석 완충제 (10 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂ 및 0.005% (v/v) 트윈®-80, 10% 프로필렌 글리콜).

2.4 mM Abz-AGLA-Nba 작업 용액을 제조하기 위하여, 1 mL의 Abz-AGLA-Nba 스톡 용액을 19 mL의 MES 완충제에 첨가하고 10초 이상 동안 철저히 혼합한다. 용액은 광으로부터 차단된 실온에서 유지한다.

프로테아제 용액을 제조하기 위하여, 써몰리신 변이체의 여과된 배양 상청액을 효소 희석 완충제에 50배 희석한다.

검정법은 형광 판독에 적합한 1회용 흑색 폴리스티렌 플랫-바텀 96-웰 마이크로 플레이트 (예를 들어, 그라이너 (Greiner) 655076)에서 수행한다. 우선, 195 μL의 2.4 mM Abz-AGLA-Nba 작업 용액을 96-웰 마이크로 검정법 플레이트의 각각의 웰에 첨가한 다음, 5 μL의 희석된 프로테아제 샘플을 첨가한다. 용액을 5초 동안 혼합하고, 마이크로 플레이트 분광형광계 (스펙트라맥스 제미니(SpectraMAX Gemini) EM, 몰레큘러 디바이시즈 (Molecular Devices))를 사용하여 25°C에서 동적 모드 (180초 내에 9회 판독, 여기 파장 350 nm, 발광 파장 415 nm, 컷 오프 필터 없음)로 형광 변화를 측정한다. RFU/초 (RFU=상대적 형광 단위) 단위의 형광 변화 속도는 프로테아제 활성의 척도를 제공한다.

C. 안정성 검정법

정의된 조건 하에 HEPES 완충제 또는 세제 용액 중 어느 하나 중에서 프로테아제 샘플을 인큐베이팅함으로써, 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 야생형 써몰리신 효소와 비교한 써몰리신 변이체의 열 안정성을 결정한다. 인큐베이션 온도는, 인큐베이션 후에 야생형 써몰리신의 잔여 활성이 초기 활성의 대략 30%가 되도록 선택된다. 초기 및 잔류 써몰리신 활성은 섹션 B에서 상기에 기재된 Abz-AGLA-Nba 검정법을 사용하여 결정한다.

이러한 일련의 검정법들에 사용되는 시약 용액은 다음과 같다:

1. 2.4 mM Abz-AGLA-Nba 작업 용액 (상기 섹션 B 참조)

2. 희석 완충제: 10 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂, 0.005% (v/v) 트윈®-80

3. HEPES 완충제: 10 mM HEPES, 0.1 mM CaCl₂, 0.005% (v/v) 트윈®-80, pH 7.15

4. AT 제형 pH 8 세제 (21° GH 물 중 2.5 g/L)

5. 썬 올인원 터보 젤 (Sun All-in-1 Turbo Gel) pH 6.3 (21° GH 물 중 3 g/L)

6. 써몰리신 변이체의 여과된 배양 상청액

이러한 일련의 검정법들에 사용되는 장비는 바이오멕(Biomek) FX 로봇 (베크만 콜터(Beckman Coulter)), 스펙트라맥스 제미니 EM 마이크로 플레이트 분광형광계 (몰레큘러 디바이시즈) 및 테트라드2 펠티어 (Tetrad2 Peltier) 열 순환기 (바이오-라드(Bio-Rad))를 포함한다.

완충제 중에서의 열 안정성 검정법

써몰리신 변이체의 배양 상청액을 HEPES 완충액에 약 1 μg/ml로 희석하고, 50 μl/웰의 희석된 효소 샘플을 96-웰 PCR 플레이트로 옮긴다. 5 μL의 효소 샘플을, 195 μL의 2.4 mM Abz-AGLA-Nba 기질 용액을 수용하는 흑색 96-웰 검정법 마이크로 플레이트 (예를 들어, 그라이너 655076)로 옮김으로써, 상기 섹션 B에 기재된 바와 같은

Abz-AGLA-Nba 검정법을 사용하여 효소 샘플의 초기 활성을 측정한다. 남아 있는 45 μ l/웰의 효소 샘플을 수용하는 PCR 플레이트를 접착 포일 시일(adhesive foil seal) (바이오-라드 B-시일)로 밀봉하고, 테트라드2 열 순환기에 넣고, 83°C에서 15분 동안 인큐베이팅한다. 인큐베이션 후에, PCR 플레이트 내의 샘플을 실온으로 냉각하고, 5 μ L의 효소 샘플을, 195 μ L의 2.4 mM Abz-AGLA-Nba 기질 용액을 수용하는 흑색 96-웰 검정법 마이크로 플레이트 (예를 들어, 그라이너 655076)로 옮김으로써, 상기 섹션 B에 기재된 바와 같은 Abz-AGLA-Nba 검정법을 사용하여 효소 샘플의 잔류 활성을 측정한다. 열 인큐베이션 후의 효소 활성을 열 인큐베이션 전의 효소 활성으로 나눈 값에 기초하여 열 안정성 활성 비를 계산하고, 잔여 활성 백분율로서 표시한다. 변이체 효소의 활성 비를, 유사하게 처리된, 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 야생형 써몰리신 효소의 활성 비와 비교함으로써 열 안정성에 대한 성능 지수를 결정한다.

[0429] 세계 안정성 검정법:

[0430] 승온에서 썬 올인원 터보 젤 (네덜란드 소재의 유니레버(Unilever))과 같이 상업적으로 공지된 액체 자동 식기 세척 세제의 0.3% (w/v) 용액 및 AT 제형 pH 8 세제 (섹션 E에 기재되어 있음)의 0.25% (w/v) 용액 중에서 스트레스 조건 하에 변이체를 인큐베이팅함으로써, 써몰리신 변이체의 세제 안정성을 모니터링한다. 10% 세제 용액을 80°C에서 2시간 동안 인큐베이팅함으로써, 구매가능한 썬 올인원 터보 젤 세제에 존재하는 효소의 열 불활성화를 수행한다. 인큐베이션 종료 시에, 측정된 pH 값은 6.3이다.

[0431] 써몰리신 변이체의 배양 상청액을 세제 용액에 약 1 μ g/ml로 희석하고, 50 μ l/웰의 희석된 효소 샘플을 96-웰 PCR 플레이트로 옮긴다. PCR플레이트를 접착 포일 시일 (바이오-라드-B 시일)로 밀봉하고, 테트라드2 열 순환기에 넣고, 15분 동안 인큐베이팅한다. 인큐베이션 온도는, 인큐베이션 후에 야생형 써몰리신의 잔여 활성이 초기 활성의 대략 30%가 되도록 선택된다. 열-불활성화된 썬 올인원 터보 젤 중의 샘플은 81°C에서 15분 동안 인큐베이팅하고, AT 제형 pH 8 세제 중의 샘플은 69°C에서 15분 동안 인큐베이팅한다. 인큐베이션 후에, PCR 플레이트 내의 샘플을 실온으로 냉각하고, 5 μ L의 효소 샘플을, 195 μ L의 2.4 mM Abz-AGLA-Nba 기질 용액을 수용하는 흑색 96-웰 검정법 마이크로 플레이트 (예를 들어, 그라이너 655076)로 옮김으로써, 상기 섹션 B에 기재된 바와 같은 Abz-AGLA-Nba 검정법을 사용하여 효소 샘플의 잔류 활성을 측정한다.

[0432] 열 인큐베이션 후 세제 용액에서의 효소 활성을 열 인큐베이션 전 HEPES 완충제에서의 효소 활성으로 나눈 값에 기초하여 세제 활성 비를 계산하고, 잔여 활성 백분율로서 표시한다.

[0433] 변이체 효소의 활성 비를, 유사하게 처리된, 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 야생형 써몰리신 효소의 활성 비와 비교함으로써 세제 안정성에 대한 성능 지수를 결정한다.

[0434] D.PAS-38 마이크로스와치 검정법:

[0435] 96-웰 마이크로 플레이트 포맷에서, 난황 및 안료 (네덜란드 소재의 센터 오브 테스트마티리얼즈(Center for Testmaterials), CFT)로 미리 염색된 폴리아크릴 스와치에 대해, 마이크로스와치 검정법을 사용하여 써몰리신 변이체의 세정 성능을 테스트한다. 이러한 프로테아제 세척-성능 검정법의 원리는, 마이크로스와치 상에 포함된 난황의 가수분해로 인한 난황 입자 및 카본 블랙 염료의 유리에 기초한다. 세척액의 405 nm에서의 흡광도를 측정하여, (원하는 조건: pH, 온도, 세제에서) 분석된 샘플에서의 프로테아제 활성의 척도를 제공한다.

[0436] 사용되는 시약 및 용액:

[0437] 1. PAS-38 마이크로스와치 (카본 블랙 염료로 착색되고 에이징된, 폴리아크릴 폐브릭 상의 난황; 네덜란드 소재의 씨에프티-블라르дин(CFT-Vlaardingen))

[0438] 2. PAP를 함유하거나 함유하지 않는, 시트레이트계 세제, pH8 (AT 제형, 섹션 E 참조)

[0439] 3. 열-불활성화된 구매가능한 액체 세제 썬 올인원 터보 젤

[0440] 4. 100 mM CAPS 완충제 pH 10.2 (헹굼 완충제)

[0441] 5. 프로필렌 글리콜을 갖는 희석 완충제: 10mM NaCl, 0.1mM CaCl₂, 0.005% 트원[®] 80 용액, 10% 프로필렌 글리콜

[0442] 세계 및 조건:

[0443] 프로테아제 샘플 (MTP 플레이트에서 성장된 박테리아 배양물의 여과된 상청액)을 몇몇 조건 하에 적절한 농도에서 테스트한다.

[0444] - AT 제형 pH 6 세제, 50°C; 검정법에서의 최종 프로테아제 농도: 약 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$

[0445] - AT 제형 pH 8 세제, 50°C; 검정법에서의 최종 프로테아제 농도: 약 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$

[0446] - AT 제형 pH 8 세제 + PAP, 50°C; 검정법에서의 최종 프로테아제 농도: 약 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$

[0447] - 썬 올인원 터보 젤, pH 6.3 세제, 50°C; 검정법에서의 최종 프로테아제 농도: 약 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

[0448] 방법

[0449] PAS-38 스와치를 5 mm 직경의 조각으로 자르고 96 웰 마이크로플레이트의 각각의 웰에 넣는다. 배양 상청액 샘플을 희석 완충제에 대략 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 희석한다. 바이오맥 FX 피펫팅 로봇을 사용하여, 세제 용액 및 희석된 효소 샘플을, PAS-38 마이크로스와치를 수용하는 96-웰 마이크로플레이트에 180 $\mu\text{l}/\text{웰}$ 의 최종 부피로 첨가한다. MTP를 접착 시일로 밀봉하고, iEMS 인큐베이터/진탕기 (써모 사이언티픽(Thermo Scientific))에 넣고, 1150 RPM으로 진탕하면서 50°C에서 30분 동안 인큐베이팅한다. 인큐베이션 후에, 각각의 웰로부터의 100 μL 의 세척액을 새로운 MTP로 옮기고, 스펙트라맥스 마이크로플레이트 분광광도계 (몰레큘러 디바이시즈)를 사용하여 405 nm에서의 흡광도를 측정한다. 이러한 값은 "초기 성능 액"으로 지칭한다. 마이크로스와치 플레이트로부터 남아 있는 세척액을 폐기하고, 마이크로스와치를 후속하여 200 μL 의 물로 1회 행군다. 마지막으로, 180 μL 의 0.1 M CAPS 완충제를 각각의 웰에 첨가하고, iEMS 인큐베이터/진탕기에서 1150 RPM로 진탕하면서 50°C에서 10분의 추가 기간 동안 MTP를 인큐베이팅한다. 이러한 인큐베이션 단계 후에, 다시 100 μL 의 액체를 새로운 MTP로 옮기고 스펙트라맥스 마이크로플레이트 분광광도계 (몰레큘러 디바이시즈)를 사용하여 405 nm에서의 흡광도를 측정한다. 이러한 값은 "헹굼액"으로 지칭한다. 두 측정치 ("초기 성능 액" 및 "헹굼액")를 함께 더하여, "총 성능"을 나타낸다. 백그라운드 배제를 위해, 마이크로스와치와 세제는 수용하지만 효소는 수용하지 않는 대조군 웰을 포함한다.

[0450] 세척 성능의 계산

[0451] 얻어진 흡광도 값을 (효소의 부재 하에 마이크로스와치의 인큐베이션 후에 얻어진) 블랭크 값에 대해 보정하며, 얻어진 흡광도는 가수분해 활성의 척도이다. 각각의 샘플에 대해 성능 지수 (PI)를 계산한다. 세척 성능 지수에 대한 PI 계산을 위해, 야생형 써몰리신에 기초한 랭류어 곡선 맞춤을 사용한다. 변이체의 단백질 농도를 사용하여, 곡선 맞춤에 기초한 예상 성능을 계산한다. 관측된 성능을 계산된 성능으로 나누고, 이어서, 이 값을, 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 야생형 써몰리신 효소의 성능으로 나눈다.

[0452] E. 세제

[0453] 2가지 세제를 사용한다:

[0454] 1. 2010년에 상업적으로 구매된 썬 올인원 터보 젤 (네덜란드 소재의 유니레버).

[0455] 2. AT 제형, 표 1.1에서 하기에 열거된 성분

[0456]

[표 1.1]

세제 AT 제형의 조성

성분	농도 mg/ml
MGDA (메틸글리신다이아세트산)	0.143
소듐 시트레이트	1.86
시트르산**	다양함
PAP* (과산 N,N-프탈로일아미노페옥시카프로산)	0.057
플루라파® LF 301 (비이온성 계면활성제)	0.029
비스무트시트레이트	0.006
베이히비트® S (포스포노부탄트라이카르복실산 소듐 염)	0.006
아큐솔™ 587 (칼슘 폴리포스페이트 억제제)	0.029
PEG 6000	0.043
PEG 1500	0.1

*PAP만을

AT 제형에 첨가하여, AT 제형 pH 8 세제 + PAP를 제조하였음.

**시트르산을 사용하여 AT 제형 세제의 pH를 원하는 값으로 조절함. 안정성 및 세척 성능 검정법 둘 모두에 대해 21°GH 물 중 0.25% 용액을 사용함.

[0457]

[0458]

F. 단백질 결정

[0459]

애질런트(Agilent) 1200 HPLC 시스템을 사용하여 배양 상청액으로부터의 써몰리신 변이체의 단백질 결정을 수행한다. 희석 완충제 (10 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂, 0.005% 트윈®-80 용액, 10% 프로필렌 글리콜) 중에서, 정제된 야생형 써몰리신 단백질 (A222 흡광도를 사용하여 결정된 농도)을 사용하여 보정 곡선 (18 ppm 내지 400 ppm)을 준비한다. 모든 샘플을 96-웰 마이크로플레이트로 옮기고, 염산 (0.3 M 최종 농도)으로 전처리하고, 4°C에서 5분 동안 인큐베이팅한다. 오토샘플러를 사용하여 크기 배제 컬럼 바이오스위트(BioSuite) 250 4 μm UHR, 4.6 × 300 mm (미국 매사추세츠주 밀포드 소재의 워터스 코포레이션(Waters Corporation))에 샘플을 로딩하기 전에, 소듐 도데실 살레이트 (SDS)를 사용하여 샘플을 2% (w/v)의 최종 농도로 처리한다. 2% (w/v) SDS를 함유하는, 25 mM 인산나트륨, pH 6을 사용하여 컬럼으로부터 샘플을 용리시킨다. 유량은 0.4 mL/min이며 14분 실행한다. UV-검출기를 사용하여 222 nm에서 샘플의 흡수를 측정하며, 단백질 농도는 보정 곡선에 기초하여 결정한다.

[0460]

변이체 효소의 발현을, 서열 번호 3의 아미노산 서열을 갖는 바실러스 써모프로테올리티쿠스 써몰리신 효소의 발현을 비교하여 성능 지수를 결정한다.

[0461]

실시예 2

[0462]

바실러스 써모프로테올리티쿠스 써몰리신 부위 평가 라이브러리 (Site Evaluation Libraries; "SEL")의 생성

[0463]

써몰리신-유사 프로테아제 (TLP)는, 써몰리신 (TLN; EC 3.4.24.27)이 프로토타입인 웨პ티다제 패밀리 M4의 구성 원이다. 바실러스 써모프로테올리티쿠스로부터 분비되는 써몰리신, (EC 3.4.24.27) 중성 메탈로 엔도-웨პ티다제의 아미노산 서열은 티타니 등에 의해 최초로 보고되었다 (문헌[Titani *et al*, (1972), Amino-acid sequence of thermolysin. *Nature New Biol.* 238:35-37]). 후속적으로, 이러한 효소의 유전자가 오도노후 등에 의해 클로닝되었으며 (문헌[O'Donohue, M.J (1994) Cloning and expression in *Bacillus subtilis* of the npr gene from *Bacillus thermoproteolyticus* Rokko coding for the thermostable metalloprotease thermolysin. *Biochem. J.* 300:599-603]), 서열은 UniProtKB/Swiss-Prot 수탁 번호 P00800로서 제시되었다 (서열 번호 4). 티타니 등에 의해 보고된 단백질 서열과 오도노후 등에 의해 보고된 단백질 서열 사이의 유일한 차이는 위치 37에서의 (Asp 대신) Asn 및 위치 119에서의 (Glu 대신) Gln의 확인이다.

[0464]

바실러스 써모프로테올리티쿠스의 전장(full-length) 써몰리신 단백질 (문헌[O'Donohue, M.J (1994) *Biochem. J.* 300:599-603]) (본 명세서에서 서열 번호 4로 나타남)은: 제오바실러스 칼도프로테올리티쿠스의 써몰리신 (문헌[Chen *et al* (2004). *Extremophiles* 8:489-498], 및 국제특허 공개 WO2009058303에 기재됨)에 대해, 바실러스 스테아로써모필루스의 nprS 유전자의 산물 (문헌[Nishiya, Y. and Imanaka, T. (1990) *J. Bacteriol.*

172:4861-4869])에 대해, 그리고 바실러스 스테아로씨모필루스 nprM (문현[M. Kubo and T. Imanaka, *J. Gen. Microbiol.* 134:1883-1892, 1988])에 대해, 99% 초과로 동일하다. 따라서 용어 "씨몰리신", "스테아로리신", "바실로리신", "프로테이나제-T", "PrT", "씨몰리신-유사 프로테아제", 및 "TLP"는 본 명세서에서 바실러스 씨모프로테올리티쿠스의 중성 메탈로프로테아제 효소를 지칭하는 데에 호환가능하게 사용된다. 바실러스 씨모프로테올리티쿠스의 전장 씨몰리신 단백질 (서열 번호 4)과 제오바실러스 칼도프로테올리티쿠스의 씨몰리신 (서열 번호 5) 사이의 유일한 서열 차이는, (프로-리전(pro-region) 내) 위치 115에서 Ser 대신에 Ala가 존재한다는 것이며, 이는 그러한 위치에 대한 코돈 내의 하나의 뉴클레오티드의 변화 (TCG로부터 GCG로)의 결과이다.

[0465] 부위 평가 라이브러리 (SEL)의 생성을 위해, pHPLT-프로테이나제T 플라스미드를 베이스클리어(BaseClear) (네덜란드 라이덴 소재)에 제공하였다. 이러한 플라스미드는 제오바실러스 칼도프로테올리티쿠스 씨몰리신 단백질 코딩 서열을 암호화한다. 전장 단백질 서열 (서열 번호 2)은, 원래 클로닝된 분자 (서열 번호 5)의 프로-리전 내의 하나의 아미노산이 상이하지만, 둘 모두 동일한 316 아미노산 성숙 단백질을 생성한다. 성숙 씨몰리신 단백질의 아미노산 서열이 서열 번호 3에 나타나 있다. 베이스클리어는 씨몰리신 성숙 단백질 내의 각각의 부위에서 위치 라이브러리를 생성하였다.

[0466] 이러한 B. 서브틸리스 발현 플라스미드, pHPLT-프로테이나제T는, 하기에 나타낸 씨몰리신 발현 카세트, B. 리체니포르미스 LAT 프로모터 (Plat), 및 pUB110로부터의 추가 요소 (문현[McKenzie et al., Plasmid, 15:93-103, 1986])를 함유하며, 이는 레플리카제 유전자 (repUB), 네오마이신/카나마이신 내성 유전자 (neo) 및 블레오마이신 내성 마커 (bleo) (미국 특허 제6,566,112호의 도 4)를 포함한다. pHPLT-프로테이나제T 플라스미드 맵에서도 1에 제공되어 있다. 씨몰리신 발현 카세트 서열은 하기에 서열 번호 1에 제공되어 있다.

[0467] 서열 번호 1은 발현 플라스미드 pHPLT-프로테이나제T로부터의 씨몰리신 유전자의 뉴클레오티드 서열을 제시한다 (천연 신호 서열은 소문자로, 천연 프로펩티드는 밑줄 친 소문자로, 성숙 서열은 대문자로 나타낸다):

```
atgaaaatgaaaatgaaattagcatgttggcttcgcgcggactagcggcccaagtatttacccatgcgtggctcaacggAACACgttacat
ggaccaacaacaatccaaacccctcaattcatctccggatctgtctgaaagtgaatggcacatcccagaagaactcgcttatcaatatgtgaaaaaaac
gaaaacaagttaaatttcatgaaaacgcataaggatacttacaattgaaagaaaaatgataaccctgggtttacgttatgcacttccaaacaaacgt
ataaagggattccctgtttggagcagtagtaactgcgcacgtgaaagatggcacgctgacggcgctatcaggacactgtccgaatttggacacga
aggatccctaaaaaggcggaaatgtgatgagaaacaaggcgcgtgacattgtctgaaaaaagatgtgcaatgtaaacttttaactctgtgaccaggaa
atgtgacacggaaaaacaccgagttgtttatgtcaatgggacgaggctttagctgacgttgtcaatttaacttttaactctgtgaccaggaa
ctggctgtatatatgtatccgttagacggaaaaatttaataaaatttaccaacttgacgcggcaaaaccaggtagcgtcaagtgcATAAACAGG
AACATCAACTGTCGGAGTGGGAAGAGGAGTACTTGGTGATCAAAAAAATTTAATACAACC
TACTCTACGTACTACTATTACAAGATAATACGCGTGAAATGGGATTTCACGTATGATGC
GAAATACCGTACGACATTGCCGGAGCTTATGGGAGATGCAGATAACCAATTGGCG
AGCTATGATGCTCAGCGGTTGATGCTCATTATTACGCTGGTGTGACATATGACTACTAA
AAATGTTCAAAACCGTCTCAGTTACGACGGAAATAATGCAGCTATTAGATCATCCGTCATT
ATAGCCAAGGCTATAAACGCAATTGGGAGCTTACGCTAAACAAAAATCCAGATTGGGAAA
TTGGAGAGGATGTGTATACACCTGGTATTGATGTGGTGTGACATGAGTTAACGCTG
GCAAAGTATGGTGTGAGTGTGCGGAATCGGACGCGATAAAATTGGGAAAATTGTTATCGTGC
GGGTTCATATCAATAGCGGAATTATCAACAAAGCGCTTATTGATTAGCCAAGGCGGTACG
CATTACGGTGTGAGTGTGCGGAATCGGACGCGATAAAATTGGGAAAATTGTTATCGTGC
ATTAACGCAATATTAAACCCAACGTCCAATTAGCCAACCTCGTGTGCTGCCGTGTTCAAT
CAGCCACTGACTTGTACGGTTGACAAGCCAGGAAGTCGCTCTGTGAAGCAGGCCTTGAT
GCGGTAGGGGTGAAA
```

[0468] 서열 번호 2는 발현 플라스미드 pHPLT-프로테이나제T로부터의 씨몰리신의 아미노산 서열을 제시한다 (천연 신호 서열은 소문자로, 천연 프로펩티드는 밑줄 친 소문자로, 성숙 서열은 대문자로 나타낸다).

mkmkmklasfglaaglaaqvflpynalastehvtwnqqfqtppqfisgdllkvngtspeelvyqyveknenkfkhenaekdtlqlkekndnlgt
 fmhfqqtykgipvfgavvtahvkdgtltalsgtlipnldtksgsllsekqardiaekdlvanvtkevpeyeqgkdtfvyyvngdeaslayvv
 nlnfltpepgnwlividavdgiklnkfnqldaakpgdvksITGTSTVGVRGVLGDQKNINTTYSTYYYYLQDNTRGN
 GIFTYDAKYRTTLPGSLWADADNQFFASYDAPAVDAHYYAGVTYDYYKNVHNRLSYDGNNA
 AIRSSVHYSQGYNNNAFWNGSQMVYGDGDGQTFIPLSGGIDVVVAELTHAVTDYTAGLIYQNES
 GAINEAISDIFGTLVEFYANKNPDWEIGEDVYTPGISGDSLRMSDPAKYGDPDHYSKRYTGTQD
 NGGVHINSGIINKAAYLISQGGTHYGVSVVIGRDKLGKIFYRALTQYLTPTSNFSQLRAAAVQS
 ATDLYGSTSQEVASVKQAFDAVGVK

[0470]

서열 번호 3은 pHPLT-프로테이나제T 플라스미드로부터 생산되는 써몰리신 성숙 단백질의 아미노산 서열을 제시한다 (316개의 잔기):

ITGTSTVGVRGVLGDQKNINTTYSTYYYYLQDNTRGNGIFTYDAKYRTT
 PGSLWADADNQFFASYDAPAVDAHYYAGVTYDYYKNVHNRLSYDGNNAI
 RSSVHYSQGYNNNAFWNGSQMVYGDGDGQTFIPLSGGIDVVVAELTHAVTD
 YTAGLIYQNESGAINEAISDIFGTLVEFYANKNPDWEIGEDVYTPGISGD
 SLRSMSDPAKYGDPDHYSKRYTGTQDNGGVHINSGIINKAAYLISQGGTH
 YGVSVVVGIGRDKLGKIFYRALTQYLTPTSNFSQLRAAAVQSATDLYGSTS
 QEVASVKQAFDAVGVK

[0472]

서열 번호 4는 바실러스 써모프로테올리티쿠스 UniProtKB/Swiss-Prot 수탁 번호 P00800으로부터의 써몰리신의 전장 아미노산 서열을 제시한다.

mkmkmklasfglaaglaaqvflpynalastehvtwnqqfqtppqfisgdllkvngtspeelvyqyveknenkfkhenaekdtlqlkekndnlgt
 fmrfqqtykgipvfgavvshvkdgltalsgtlipnldtksgsllsekqardiaekdlvanvtkevpeyeqgkdtfvyyvngdeaslayvv
 nlnfltpepgnwlividavdgiklnkfnqldaakpgdvksITGTSTVGVRGVLGDQKNINTTYSTYYYYLQDNTRGN
 GIFTYDAKYRTTLPGSLWADADNQFFASYDAPAVDAHYYAGVTYDYYKNVHNRLSYDGNNA
 AIRSSVHYSQGYNNNAFWNGSQMVYGDGDGQTFIPLSGGIDVVVAELTHAVTDYTAGLIYQNES
 GAINEAISDIFGTLVEFYANKNPDWEIGEDVYTPGISGDSLRMSDPAKYGDPDHYSKRYTGTQD
 NGGVHINSGIINKAAYLISQGGTHYGVSVVIGRDKLGKIFYRALTQYLTPTSNFSQLRAAAVQS
 ATDLYGSTSQEVASVKQAFDAVGVK

[0473]

서열 번호 5는 제오바실러스 칼도프로테올리티쿠스로부터의 써몰리신의 전장 아미노산 서열을 제시한다 (문헌 [Chen et al (2004). Extremophiles 8:489-498], 및 국제특허 공개 WO2009058303호에 기재됨).

mkmkmklasfglaaglaaqvflpynalastehvtwnqqfqtppqfisgdllkvngtspeelvyqyveknenkfkhenaekdtlqlkekndnlgt
 fmrfqqtykgipvfgavvtahvkdgtltalsgtlipnldtksgsllsekqardiaekdlvanvtkevpeyeqgkdtfvyyvngdeaslayvv
 nlnfltpepgnwlividavdgiklnkfnqldaakpgdvksITGTSTVGVRGVLGDQKNINTTYSTYYYYLQDNTRGN
 GIFTYDAKYRTTLPGSLWADADNQFFASYDAPAVDAHYYAGVTYDYYKNVHNRLSYDGNNA
 AIRSSVHYSQGYNNNAFWNGSQMVYGDGDGQTFIPLSGGIDVVVAELTHAVTDYTAGLIYQNES
 GAINEAISDIFGTLVEFYANKNPDWEIGEDVYTPGISGDSLRMSDPAKYGDPDHYSKRYTGTQD
 NGGVHINSGIINKAAYLISQGGTHYGVSVVIGRDKLGKIFYRALTQYLTPTSNFSQLRAAAVQS
 ATDLYGSTSQEVASVKQAFDAVGVK

[0474]

써몰리신 변이체의 생산

[0475]

베이스클리어 비브이(BaseClear BV; 네덜란드 라이덴 소재)에 의해 316개의 잔기 각각에 대해 위치 라이브러리를 구축하였다. 라이브러리는 성숙 단백질의 316 위치에서 써몰리신 변이체 서열을 암호화하는 발현 플라스미드를 함유하는 형질전환된 B. 서브ти리스 세포로 이루어졌다. 단백질 활성 평가 전에 DNA 서열 분석에 의해 각각의 변이체를 확인하였다. 개별 클론을 하기에 기재된 바와 같이 배양하여, 기능적 특성화를 위한 상이한 써몰리신 변이체들을 얻었다.

[0476]

단백질 발현

[0480] 써몰리신 변이체를 함유하는 B. 서브틸리스 형질전환체를 96 웰 플레이트에서 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 네오마이신을 갖는 트립틱 소이 브로쓰(Tryptic Soy Broth; TSB) 중에서 16시간 동안 배양하고, 10 μl 의 이러한 예비-배양물을 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 네오마이신이 보충된 190 μl 의 배양 배지 (하기에 기재됨)로 충전된 코닝(Corning) 3599 MTP에 첨가하였다. 플레이트를 22 내지 26시간 동안 37°C, 80% 습도에서 300 rpm으로 일정하게 회전 혼합하면서 인큐베이팅 하였다. 세포를 2500 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 수거하고, 밀리포어(Millipore) 진공 시스템을 사용하여 밀리포어 멀티스크린(Millipore Multiscreen) 필터 플레이트를 통해 여과하였다. 수거한 후에, 프로필렌 글리콜을 배양 상청액에 10%의 최종 농도로 첨가하고, 이러한 샘플을 검정법에 사용하였다. 배양 배지는, 포스페이트 완충제, 주 탄소 공급원으로서의 글루코스 및 말토덱스트린을 기반으로 하고, 왕성한 세포 성장을 위해 0.2% 소이톤 및 0.14% 효모 추출물이 보충된, 풍부화된 반-한정 배지였다.

실시예 3

조합가능 돌연변이의 동정

[0483] 생산 위치는, 개선된 특성을 나타내는 조합 변이체를 제조하는 데 가장 유용한, 분자 내의 그러한 위치로서 설명되는데, 그러한 위치 그 자체가 적어도 하나의 조합가능 돌연변이를 가능하게 한다. 조합가능 돌연변이는 조합 변이체를 제조하는 데 사용될 수 있는 분자 내의 그러한 치환으로서 설명될 수 있다. 조합가능 돌연변이는 발현, 활성 또는 안정성 중 어느 것도 유의하게 감소시키지는 않으면서, 분자의 적어도 하나의 원하는 특성을 개선하는 것이다.

[0484] 조합가능 돌연변이는 발현, 활성 또는 안정성 중 어느 것도 유의하게 감소시키지는 않으면서, 분자의 적어도 하나의 원하는 특성을 개선하는 것이다. 써몰리신에서의 조합가능 돌연변이는 실시예 1에 기재된 검정법: Abz-AGLA-Nba 프로테아제 검정법 (활성), PAS-38 마이크로스와치 검정법 (활성), 세제 안정성 및 열 안정성 검정법, 및 단백질 결정 (발현)으로부터 얻은 성능 지수 (PI) 값을 사용하여 결정하였다.

[0485] 조합가능 돌연변이에 더하여, 써몰리신에 대한 돌연변이의 제2 그룹은 활성 조합가능 돌연변이이다. 활성 조합 가능 돌연변이는, 발현 또는 안정성 PI 값 중 어느 것도 0.5 미만으로 감소시키지 않으면서, 1.5 이상의 성능 지수로, 분자의 적어도 하나의 활성 특성을 개선하는 것이다.

[0486] 조합가능 돌연변이는 (표 3.1에 요약된) 하기 기준들에 따라 그룹화하였다:

[0487] pH6 또는 pH8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.9 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.0 이상인 변이체 (그룹 A)

[0488] pH6 또는 pH8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.8 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.2 이상인 변이체 (그룹 B)

[0489] pH6 또는 pH8에서의 PAS-38 마이크로스와치 세정성, Abz-AGLA-Nba에 대한 활성, 세제 안정성 및 열 안정성에 대해 써몰리신 부모에 대한 최소 성능 지수 (PI)가 0.5 이상이고, 추가적으로 이러한 테스트들 중 어느 하나에 대한 PI가 1.5 이상인 변이체 (그룹 C)

[표 3.1]

써몰리신 변이체의 조합가능 돌연변이를 그룹화하는 데 사용되는 기준의 요약

그룹	발현 PI	세정성 (pH 6 또는 pH 8에서) PI	합성 기질 활성 PI	안정성 (세제 또는 열) PI	하나 이상의 테스트에서 X 이상의 PI
A	≥ 0.9	≥ 0.9	≥ 0.9	≥ 0.9	$X \geq 1.0$
B	≥ 0.8	≥ 0.8	≥ 0.8	≥ 0.8	$X \geq 1.2$
C	≥ 0.5	≥ 0.5	≥ 0.5	≥ 0.5	$X \geq 1.5$

[0491] [0492] 그룹 A, B, 및 C는 다수 치환에 대한 상이한 정도의 허용오차를 갖는 아미노산 위치를 추가로 포함한다. 생산 위치를 동정하기 위해, 각각의 위치에서 허용되는 치환도를 측정하고, 각각의 위치에 생산성 스코어를 할당한다. 하기에 제시된 기준들을 사용하여, 그룹 A, B, 또는 C에 해당하는 각각의 위치 내에 있는 (테스트된 변이체들 모두에 기초하여 계산된) 치환의 백분율에 따라 생산성 스코어를 할당하였다.

[0493] 생산 위치는 다수 치환에 대한 소정의 허용오차의 정도를 나타낸 위치로서 정의되는 한편, 동시에 하기에 제시된 바와 같은 조합가능성(combinability)에 대한 일련의 기준들을 만족한다.

[0494] 생산 위치에 대한 생산성 스코어를 결정하기 위한 기준들은 다음과 같다:

[0495] • 주어진 위치에서의 치환들 중 15% 미만이 그룹 A, B, 또는 C에 해당하는 위치에는 생산성 스코어 "1"을 부여한다.

[0496] • 주어진 위치에서의 치환들 중 40% 미만 그러나 15% 이상이 그룹 A, B, 또는 C에 해당하는 위치에는 생산성 스코어 "2"를 부여한다.

[0497] • 주어진 위치에서의 치환들 중 75% 미만 그러나 40% 이상이 그룹 A, B, 또는 C에 해당하는 위치에는 생산성 스코어 "3"을 부여한다.

[0498] • 주어진 위치에서의 치환들 중 75% 이상이 그룹 A, B, 또는 C에 해당하는 위치에는 생산성 스코어 "4"를 부여한다.

[0499] 치환이 나타나는 그룹(들)(A, B, C)에 기초하여 이러한 아미노산 치환에 적합성 스코어를 추가로 할당하는데, 더 높은 적합성 스코어는 조합 변이체를 제조하는 데 사용하기에 더 적합한 치환을 나타낸다. 적합성 스코어가 표 3.2에 정의되어 있다.

표 3.2는 각각의 적합성 스코어를 조합가능 돌연변이 및 생산 위치의 그룹들에 연관지어 정의한다.

그룹(들)에서 발생한 치환:	적합성 스코어
A, B 및 C	++++
A 및 B	+++
A 또는(B 및 C)	++
B	+
C	

[0501] 표 3.2는 전술한 생산성 스코어 "4"에 해당하는 써몰리신에서의 생산 위치 및 조합가능한 그러한 위치 내의 치환을 나타낸다. 위치는 서열 번호 3에 열거된 성숙 써몰리신 단백질에 기초하여 번호가 매겨진다.

[0503]

POS	치환, WT 1ST	생산성 스코어
2	T,F,L,P,S,V,W,Y,Q,A,C,I,K,M	4
26	T,K,L,R,V,Y,W,F,G,H,I,M,C,D	4
47	R,A,C,H,K,N,D,E,G,L,M,Q,T	4
49	T,A,D,F,H,I,S,W,L,N,Q,V,E,M,Y	4
53	S,F,H,I,M,Q,T,W,K,R,A,N,V,C,L	4
65	S,I,M,Q,V,L,T,W,A,D,E,P,Y	4
87	V,D,E,G,I,S,P,R,T,C,K,L,M,N,Q,W,Y	4
91	L,D,E,F,K,M,P,Q,S,A,N,R,W,Y	4
96	N,C,D,I,V,F,T,G,H,Q,R,S,W,K,L,Y	4
108	Q,C,E,F,H,A,D,I,K,N,L,M	4
118	S,C,G,E,A,D,M,Q,R,T,V	4
128	Q,C,D,E,R,S,V,I,K,A,L,Y	4
154	G,L,Q,S,T,D,I,W,C,N,A,H,K,M,Y	4
179	Y,A,D,H,M,N,Q,S,T,W,F	4
196	G,D,E,T,K,R,V,H,L,Y,A,W	4
197	I,D,K,L,T,V,W,Y,A,H,N,E,Q,R,F,C	4
198	S,C,E,F,G,H,I,P,Q,T,V,M,N,R,W,A,K	4
199	G,C,E,F,H,Q,S,T,W,L,A,Y	4
209	A,D,E,L,S,T,V,G,I,K,P,R,Y,C,M	4
211	Y,A,C,D,F,G,H,I,L,N,Q,S,T,E,R	4
217	Y,Q,S,T,V,W,G,A,F,M,N,C,L	4
219	K,D,F,G,H,I,M,N,Q,T,A,E,R,S	4
225	Q,D,G,H,I,P,V,W,A,M,R,C,E,K,L,S	4
232	I,C,E,F,K,M,N,Q,W,G,L,R,S,T,V,Y	4
256	V,L,T,K,A,D,F,G,H,R,S,N	4
257	G,C,D,E,L,N,P,Q,S,T,Y,K,R	4
259	G,A,C,E,F,H,L,M,W,K,R,N,S,T	4
261	D,A,N,P,V,W,G,H,I,S	4
265	K,A,C,D,M,P,Q,S,G,I,L,R,N	4
267	F,E,G,N,S,V,W,A,C,H,I,K,L,M,T,Y	4
272	T,E,L,V,W,P,Y,C,F,N,Q,A,K	4
276	T,C,F,I,P,Q,W,H,A,L,V,Y	4
277	P,Q,S,T,E,F,G,H,N,R,V,W,A,D,Y	4
286	A,D,E,F,G,H,I,S,P,C,Q,R,T,K,L,M,N,Y	4
289	V,C,E,F,G,I,N,S,W,R,T,L,M,Y,A	4
290	Q,C,D,F,G,L,W,Y,R,T,V,A,H,N	4
293	T,C,E,F,G,H,Q,S,N,V,W,A,I,K,L,M,Y	4
295	L,C,I,N,T,V,F,G,A,K,M,W	4
298	S,C,T,W,Y,E,N,P,A,G,K,M,R	4
299	T,C,F,L,M,R,W,P,D,Q,N,A,K	4
300	S,C,K,M,R,Y,I,L,H,P,V,W,A,G,T,D,N	4
301	Q,E,H,P,R,L,C,F,G,W,M,S,T,V,K	4
303	V,C,H,G,K,L,R,W,A,P,Y	4
305	S,G,I,L,N,W,Y,Q,H,T,V,A,K,M	4
308	Q,C,D,F,G,I,M,R,V,W,Y,A,L	4
311	D,C,E,F,G,I,Q,S,T,A,K,L,M,V,W,Y	4
316	K,D,E,F,G,H,L,N,P,Q,R,S,V,W,Y,A,M	4

[0504]

표 3.4는 전술한 생산성 스코어 "3"에 해당하는 써몰리신에서의 생산 위치 및 조합가능한 그러한 위치 내의 치환을 나타낸다. 위치는 서열 번호 3에 열거된 성숙 써몰리신 단백질에 기초하여 번호가 매겨진다.

[0506]

[표 3.4]

POS	치환, WT 1ST	생산성 스코어
1	I,K,M,V,A,H,W,Y,C,L	3
4	T,E,A,N,R,V,K,L,M,Y	3
17	Q,I,W,Y,C,R,V,T,L	3
25	S,D,F,A,C,K,M,R	3
40	F,E,G,M,Q,S,Y,W,A,K,L	3
45	K,E,L,S,F,H,Q,Y,A,G,M	3
56	A,K,Q,V,W,H,I,Y,E,M	3
58	A,N,Y,C,V,E,L	3
61	Q,M,R,W,F,V,C,I,L	3
74	H,E,L,V,C,F,M,N,Q,W	3
86	N,L,S,Y,A,C,E,F,G,K,D	3
97	N,K,C,R,S,Y,E,M	3
101	R,T,C,L,S,H	3
109	G,A,L,S,E,M,R,W	3
149	T,M,V,A,L,D,S,N	3
150	D,A,F,K,N,Q,T,V,S	3
158	Q,A,K,M,N,L,R,Y,S	3
159	N,R,W,A,C,G,M,T,S,Y	3
172	F,G,L,M,Q,S,V,W,Y,D,H	3
181	N,L,A,G,K,M,T,S	3
214	P,C,G,K,S,N,A,R	3
216	H,C,E,S,T,R,A	3
218	S,K,L,Y,F,G,T,V	3
221	Y,K,N,Q,R,S,T,V,A,F,G,M	3
222	T,C,D,L,Y,I,V,A,M,K	3
224	T,K,M,F,L,P,Q,V,Y,E,H	3
250	H,A,C,K,M,N,P,Q,R,V,Y	3
253	V,N,T,I,R,Y,M,Q	3
254	S,A,M,R,Y,K,L,N,V,W	3
258	I,E,L,M,N,R,S,A,C,K,Q,V	3
263	L,C,I,Q,T,H,K,N,V,A,M	3
264	G,C,R,A,N,P,Q,S,T	3
266	I,A,F,L,S,C,M,T,V	3
268	Y,M,Q,V,A,S,K	3
271	L,A,D,F,I,N,Y,H	3
273	Q,A,H,Y,C,S,W,E,G,N	3
275	L,I,M,V,C,Q,S,T	3
278	T,G,K,R,Y,C,H,M,N,Q,S	3
279	S,A,D,I,L,M,N,Q,T,G	3
280	N,A,C,D,E,G,Q,H,T	3
282	S,K,N,R,A,H,L,M,T	3
283	Q,K,L,P,R,W,Y,S	3
287	A,I,L,N,V,Y,K,R,T,D,C	3
288	A,C,I,S,T,V,Y,N,L,M	3
291	S,E,I,L,M,N,V,A,T	3
297	G,A,M,R,Y,C,F,K,T,D,N	3
302	E,K,L,G,T,V,D,Q,A	3
304	A,C,D,L,N,R,S,T,W,E,K,Y	3
307	K,A,C,G,I,M,N,Q,R,W,Y,H	3
312	A,G,M,V,L,N,R,T,C	3

[0507]

[0508]

표 3.5는 전술한 생산성 스코어 "2"에 해당하는 써몰리신에서의 생산 위치 및 조합가능한 그러한 위치 내의 치환을 나타낸다. 위치는 서열 번호 3에 열거된 성숙 써몰리신 단백질에 기초하여 번호가 매겨진다.

[0509]

[표 3.5]

POS	치환, WT 1ST	생산성 스코어
5	S,D,N,P,H,L	2
9	V,L,T,I	2
11	R,I,Y,K	2
19	N,L,Y,K,S	2
27	Y,W,A,M,V,C,L	2
31	Q,A,K,V,I,C,Y	2
33	N,S,T,K,A,C,L,M	2
37	N,D,Q,R,L,K	2
46	Y,L,H,N,C	2
64	A,H,Q,T,D,E	2
73	A,I,F,L,M,W	2
76	Y,H,L,M,Q,T	2
79	V,L,Q,T,A,N,S	2
80	T,I,D,A,L,N	2
85	K,E,A,L,N,R,S	2
89	N,L,M,H	2
95	G,A,D,H,M,N,S	2
98	A,C,E,H,R,Y,K,V	2
99	A,E,K,P,R,S	2
107	S,D,K,Y,A,G	2
127	G,C,D,E	2
129	T,I,R,E,Y,L,M	2
131	I,Y,W,L	2
137	I,P,A,E,T,V,L	2
141	A,S,C,G	2
145	T,A,C,E,G,M,N,Q	2
148	V,L,N,Y,M,A,Q	2
151	Y,K,G,H,S,W	2
152	T,S,L,M,G	2
155	L,C,I,M	2
156	I,M,T,L,Q	2
160	E,L,Y,Q	2
161	S,A,N,P,T	2
164	I,L,N,S,T,V,C,A	2
168	I,A,M,T,L	2
171	I,C,E,F,L,S,G	2
176	V,L,N,C	2
180	A,E,G,K,T,S	2
182	K,L,A,W	2
187	E,L,D	2
188	I,L,V	2
205	M,L,A,V,Q	2
206	S,A,C,K,L,M,R	2

[0510]

POS	치환, WT 1ST	생산성 스코어
207	D,A,H,N	2
210	K,I,L,V	2
212	G,Y,A,D,Q	2
213	D,N,S,L,A,G,W	2
220	R,K,V,A	2
227	N,D,L,Y,A	2
234	S,D,N,A,C	2
235	G,M,C,Q,S,A	2
236	I,M,A,C	2
237	I,N,F,M	2
242	Y,C,F,N,V	2
244	I,T,V,F,A,M,L	2
246	Q,E,N,T,L,C,D	2
248	G,A,E,S	2
249	T,K,M,N,L,Y,P	2
252	G,K,Y,A,S,T,W	2
255	V,L,P,A,Y,M,N	2
270	A,C,F,I,L,S,G	2
274	Y,F,H,A,C,Q,T,M	2
284	L,V,W,A,M,Y	2
294	D,A,V,Q,N	2
296	Y,N,L,R,H,W,M	2
306	V,A,S,F,I,L,T	2
309	A,G,S,T,V,C	2
310	F,A,C,W,M	2
313	V,T,A,G,L,I,C	2
314	G,A,E,H,M,S,W,Q	2
315	V,A,C,I,M,L,T	2

[0511]

표 3.6은 전술한 생산성 스코어 "1"에 해당하는 씨몰리신에서의 생산 위치 및 조합가능한 그러한 위치 내의 치환을 나타낸다. 위치는 서열 번호 3에 열거된 성숙 씨몰리신 단백질에 기초하여 번호가 매겨진다.

[표 3.6]

POS	치환, WT 1ST	생산성 스코어
3	G,Y	1
6	T,C,V	1
7	V,L,I	1
20	I,L,V	1
23	T,F,W	1
24	Y,W	1
44	A,C	1
48	T,E,D	1
50	L,P	1
57	D,K	1
63	F,Y,C	1
72	D,F,W	1
75	Y,A	1
81	Y,F	1
92	S,L	1
93	Y,T,C	1
94	D,T	1
100	I,L,V	1
102	S,G,N	1
103	S,T	1
104	V,A	1
110	Y,L	1
117	G,H	1
120	M,L	1
134	S,A,P	1
135	G,A	1
136	G,A,S	1
140	V,D	1
144	L,T	1
153	A,T	1
173	G,A,C	1
174	T,C,A	1
175	L,H,S	1
178	F,H,Y	1
183	N,S	1
185	D,E	1
189	G,A	1
193	Y,F	1
201	S,C,A	1
223	G,D,K	1
230	V,A	1
238	N,L,M	1
239	K,A	1
241	A,L,S	1
247	G,A,S	1
251	Y,M	1
260	R,A,N	1
262	K,A	1
269	R,V,K	1
285	R,K,Y	1

[0514]

[0515] 실시예 4

[0516] 조합가능 돌연변이 및 적합성 스코어

실시예 3에 나타난 바와 같이, 실시예 1에 기재된 검정법으로부터 얻은 성능 지수 (PI) 값을 사용하여 써몰리신에서의 조합가능 돌연변이를 결정하였다.

조합가능 돌연변이를 실시예 3에서 제시된 기준들에 따라 그룹 A, B 또는 C로 할당하였다. 치환이 나타나는 그룹(들)(A, B, C)에 기초하여 이러한 치환에 적합성 스코어를 추가로 할당하는데, 더 높은 적합성 스코어는 조합변이체를 제조하는 데 사용하기에 더 적합한 치환을 나타낸다. 적합성 스코어가 표 4.1에 정의되어 있다. 상기 기준들에 맞는 써몰리신의 개별적인 치환에 대한 적합성 스코어가 하기에 기록되어 있다.

[0519] 표 4.1은 각각의 적합성 스코어를 조합가능 돌연변이 및 생산 위치의 그룹들에 연관지어 정의한다.

그룹(들)에서 발생한 치환:	적합성 스코어
A, B 및 C	+++++
A 및 B	++++
A 또는 (B 및 C)	+++
B	++
C	+

[0520]

[0521] 적합성 스코어 ++++를 갖는 변이체:

[0522] I001L, T002A, T002C, T002I, T002K, T004K, T004L, T004M, T004Y, Q017L, N037K, F040K, F040L, K045A, K045G, K045M, T049E, T049M, T049Y, L050P, S053C, S053L, A056M, A058E, A058L, Q061L, F063C, A064D, A064E, S065A, S065D, S065E, S065P, S065Y, V087C, V087K, V087L, V087M, V087N, V087Q, V087W, V087Y, N096K, N096L, N096Y, R101H, Q108L, Q108M, G109E, G109M, G109R, G109W, S118A, S118D, S118M, S118Q, S118R, S118T, S118V, Q128A, Q128L, Q128Y, I131L, I137L, T149N, G154A, G154H, G154K, G154M, G154Y, L155M, I164A, N181S, G196A, G196W, I197C, S198A, S198K, G199A, G199Y, A209C, A209M, H216A, Y217C, Y217L, T222K, N227A, I244L, Q246D, V256N, L263A, L263M, T272K, Q273N, Y274M, P277A, P277D, P277Y, L284A, L284M, L284Y, A286K, A286L, A286M, A286N, A286Y, A287C, A288L, A288M, V289A, S291A, S291T, T293A, T293I, T293K, T293L, T293M, T293Y, L295A, L295K, L295M, L295W, Y296M, G297N, S298A, S298G, S298K, S298M, S298R, T299A, T299K, S300D, S300N, Q301K, E302A, V303A, V303P, V303Y, A304E, A304K, A304Y, S305A, S305K, S305M, V306L, V306T, A309C, F310M, D311A, D311K, D311L, D311M, D311V, D311W, D311Y, 및 A312C

[0523] 적합성 스코어 +++를 갖는 변이체:

[0524] T002Q, T004V, V007I, V009I, R011K, I020L, I020V, S025A, S025C, S025K, S025M, S025R, T026C, T026D, Y027C, Y027L, N037L, F040A, A044C, K045F, K045H, K045Q, K045Y, Y046C, R047D, R047E, R047G, R047L, R047M, R047Q, R047T, T049L, T049N, T049Q, T049V, S053A, S053N, S053V, A056E, Q061C, Q061I, A064T, S065L, S065T, S065W, A073F, A073L, A073M, A073W, H074C, H074F, H074M, H074N, H074Q, H074W, T080L, T080N, K085S, N086D, V087R, V087T, L091A, L091N, L091R, L091W, L091Y, S092L, Y093C, N096G, N096H, N096Q, N096R, N096S, N096W, N097E, N097M, A099R, A099S, R101C, R101L, R101S, S102N, S107G, Q108I, Q108K, Q108N, G109S, S118E, M120L, Q128I, Q128K, T129L, T129M, I131W, S134P, G136S, I137E, I137T, I137V, V140D, V148A, V148Q, T149D, T149S, T152G, G154C, G154N, L155I, N159S, N159Y, I164C, I168L, I171G, Y179F, A180S, G189A, Y193F, G196H, G196L, G196Y, I197F, S198M, S198N, S198R, S198W, S201A, A209G, A209I, A209K, A209P, A209R, A209Y, Y211E, Y211R, P214A, P214R, Y217A, Y217F, Y217M, Y217N, K219A, K219E, K219R, K219S, R220A, Y221A, Y221F, Y221G, Y221M, T222A, T222M, Q225C, Q225E, Q225K, Q225L, Q225S, I232L, I232R, I232S, I232T, I232V, I232Y, S234A, S234C, G235A, I236C, I244A, I244M, Q246C, V256S, G257K, G257R, I258A, I258C, I258K, I258Q, I258V, G259N, G259S, G259T, L263H, L263K, L263N, L263V, G264A, G264N, G264P, G264Q, G264S, G264T, K265N, I266C, I266M, I266T, I266V, F267A, F267C, F267H, F267I, F267K, F267L, F267M, F267T, F267Y, R269K, A270G, L271H, T272A, Q273E, Q273G, L275C, L275Q, L275S, L275T, T276A, T276L, T276V, T276Y, P277E, P277F, P277G, P277H, P277N, P277R, P277V, P277W, S279G, R285Y, A286C, A286Q, A286R, A286T, A288N, V289L, V289M, V289Y, Q290A, Q290H, Q290N, S291V, T293N, T293V, T293W, D294N, L295F, L295G, Y296W, G297D, S298E, S298N, S298P, T299N, S300A, S300G, S300T, Q301M, Q301S, Q301T, Q301V, E302D, E302Q, V303G, V303K, V303L, V303R, V303W, A304R, A304S, A304T, A304W, S305H, S305T, S305V, V306I, Q308A, Q308L, F310C, F310W, D311F, D311G, D311I, D311Q, D311S, D311T, V313C, G314Q, V315L, V315T, K316A, 및 K316M

[0525] 적합성 스코어 ++를 갖는 변이체:

[0526] I001K, I001M, I001V, T002F, T002L, T002P, T002S, T002V, T002W, T002Y, T004E, S005D, S005N, S005P, T006C, R011I, Q017I, Q017W, Q017Y, S025D, S025F, T026K, T026L, T026R, T026V, T026Y, Y027W, Q031A, Q031K, Q031V, N033S, N033T, N037D, N037Q, N037R, F040E, F040G, F040M, F040Q, F040Y, K045E,

K045L, K045S, Y046L, R047A, R047C, R047H, R047K, R047N, T048E, T049A, T049D, T049F, T049H, T049I, T049S, S053F, S053H, S053I, S053M, S053Q, S053T, S053W, A056K, A056Q, A056V, A056W, Q061M, S065I, S065M, S065Q, S065V, D072F, H074E, H074L, Y076H, Y076L, Y076M, Y076Q, V079L, V079Q, V079T, T080I, Y081F, K085E, N086L, N086S, V087D, V087E, V087G, V087I, V087S, L091D, L091E, L091F, L091K, L091M, L091P, L091Q, L091S, Y093T, G095A, G095D, G095H, G095M, G095N, G095S, N096C, N096D, N096I, N096V, N097K, A098C, A098E, A098H, A098R, A099E, A099K, A099P, S107D, Q108C, Q108E, Q108F, Q108H, G127C, G127D, G127E, Q128C, Q128D, Q128E, Q128R, Q128S, T129I, T129R, S134A, I137P, A141S, T145A, T145C, T145E, T145G, T145M, T145N, T145Q, V148L, V148N, V148Y, T149M, T149V, Y151K, T152S, A153T, G154L, G154Q, G154S, G154T, L155C, Q158A, Q158K, Q158M, Q158N, N159R, N159W, S161A, S161N, S161P, S161T, I164L, I164N, I164S, I164T, I164V, I171C, I171E, I171F, I171L, I171S, F172G, F172L, F172M, F172Q, F172S, F172V, F172W, F172Y, G173A, G173C, T174C, V176L, V176N, N181L, G196D, G196E, G196T, I197D, I197K, I197L, I197T, I197V, I197W, I197Y, S198C, S198E, S198F, S198G, S198H, S198I, S198P, S198Q, S198T, S198V, G199C, G199E, G199F, G199H, G199Q, G199S, G199T, G199W, M205L, A209D, A209E, A209L, A209S, A209T, A209V, Y211A, Y211C, Y211D, Y211F, Y211G, Y211H, Y211I, Y211L, Y211N, Y211Q, Y211S, Y211T, D213N, D213S, P214C, P214G, P214K, P214S, H216C, H216E, H216S, H216T, Y217Q, Y217S, Y217T, Y217V, Y217W, S218K, S218L, S218Y, K219D, K219F, K219G, K219H, K219I, K219M, K219N, K219Q, K219T, R220K, R220V, Y221K, Y221N, Y221Q, Y221R, Y221S, Y221T, Y221V, T222C, T222D, T222L, T222Y, T224K, T224M, Q225D, Q225G, Q225H, Q225I, Q225P, Q225V, Q225W, I232C, I232E, I232F, I232K, I232M, I232N, I232Q, I232W, S234D, G235M, I236M, Y242C, Y242F, Y242N, Y242V, I244T, I244V, Q246E, Q246N, Q246T, G247A, G247S, T249K, T249M, T249N, H250A, H250C, G252K, G252Y, V253N, V253T, S254A, S254M, S254R, S254Y, V255L, V255P, V256L, V256T, G257C, G257D, G257E, G257L, G257N, G257P, G257Q, G257S, G257T, G257Y, I258E, I258L, I258M, I258N, G259A, G259C, G259E, G259F, G259H, G259L, G259M, G259W, D261A, D261N, L263C, L263I, L263Q, L263T, K265A, K265C, K265D, K265M, K265P, K265Q, K265S, I266A, I266F, I266L, I266S, F267E, F267G, F267N, F267S, F267V, F267W, Y268M, Y268Q, Y268V, A270C, A270F, A270I, A270L, A270S, L271A, L271D, L271F, L271I, T272E, T272L, T272V, T272W, Q273A, Q273H, Q273Y, Y274F, Y274H, L275I, L275M, L275V, T276C, T276F, T276I, T276P, T276Q, T276W, P277Q, P277S, P277T, T278G, S279A, S279D, S279I, S279L, S279M, S279N, S279Q, S279T, N280A, N280C, N280D, N280E, S282K, S282N, L284V, L284W, R285K, A286D, A286E, A286F, A286G, A286H, A286I, A286S, A287I, A287L, A287N, A287V, A287Y, A288C, A288I, A288S, A288T, A288V, V289C, V289E, V289F, V289G, V289I, V289N, V289S, V289W, Q290C, Q290D, Q290F, Q290G, Q290L, Q290W, S291E, T293C, T293E, T293F, T293G, T293H, T293Q, T293S, L295C, L295I, L295N, Y296N, G297A, G297M, G297R, G297Y, S298C, S298T, S298W, S298Y, T299C, T299F, T299L, T299M, T299R, T299W, S300C, S300K, S300M, S300R, S300Y, Q301E, Q301H, Q301Q, Q301R, V303C, V303H, A304C, A304D, A304L, A304N, S305G, S305I, S305L, S305N, S305W, S305Y, V306A, V306S, K307A, K307C, K307G, K307I, K307M, K307N, K307Q, K307R, K307W, K307Y, Q308C, Q308D, Q308F, Q308G, Q308I, Q308M, A309G, A309S, D311C, D311E, A312G, A312M, A312V, V313T, G314A, G314E, G314H, G314M, G314S, G314W, V315A, V315C, V315I, V315M, K316D, K316E, K316F, K316G, K316H, K316L, K316N, K316P, K316Q, K316R, K316S, K316V, K316W, 및 K316Y

적합성 스코어 ++를 갖는 변이체:

I001C, T004R, T006V, Q017T, N019K, N019S, T023F, T023W, Y024W, T026F, T026G, T026H, T026I, T026M, Y027M, Y027V, Q031C, Q031Y, N033A, N033C, N033L, N033M, Y046H, Y046N, T048D, T049W, A058C, A058V, Q061F, Q061V, A064H, A064Q, D072W, A073I, H074V, Y076T, V079S, T080A, K085A, K085L, K085N, K085R, N086A, N086C, N086E, N086F, N086G, N086K, N089H, N096F, N096T, N097C, N097R, N097S, N097Y, A098K, A098V, I100L, I100V, R101T, S102G, S103T, S107A, Q108D, G117H, S118G, Q128V, T129Y, G136A, A141G, L144T, V148M, D150S, Y151G, Y151H, Y151S, Y151W, G154D, G154I, G154W, I156L, I156Q, Q158S, N159A, N159C, N159G, N159M, N159T, E160Q, I168A, I168M, I168T, F172D, F172H, L175S, V176C, F178H, F178Y, Y179A, Y179D, Y179H, Y179M, Y179N, Y179Q, Y179S, Y179T, Y179W, A180E, A180G, A180K, A180T, N181G, N181K, N181M, N181T, K182A, K182W, N183S, D185E, E187D, I188V, G196K, G196R, G196V, I197E, I197Q, I197R, G199L, S201C, M205Q, S206M, S206R, D207H, D207N, K210I, K210L, K210V, G212A, G212D, G212Q, D213A, D213G, D213W, P214N, Y217G, S218G, S218T, S218V, T222I, T222V, G223D, G223K, T224E, T224H, Q225A, Q225M, Q225R, V230A, I232G, S234N, G235C, G235Q, G235S, I237F, I237M, I244F, G248A, G248E,

G248S, T249P, Y251M, G252A, G252S, G252T, G252W, V253M, V253Q, S254N, S254V, S254W, V255M, V255N, V256A, V256D, V256F, V256G, V256H, V256R, I258R, I258S, G259K, G259R, R260A, R260N, D261G, D261H, D261I, D261S, G264C, G264R, K265G, K265I, K265L, K265R, Y268K, L271N, L271Y, T272C, T272F, T272N, T272Q, Y274C, Y274Q, Y274T, T276H, T278C, T278H, T278M, T278N, T278Q, T278S, N280H, N280T, S282A, S282H, S282L, S282M, S282T, Q283S, A286P, A287D, A288Y, V289R, V289T, Q290R, Q290T, Q290V, D294Q, L295T, L295V, Y296H, G297C, G297F, G297K, G297T, T299D, T299Q, S300H, S300P, S300V, S300W, Q301C, Q301F, Q301G, Q301W, E302G, E302T, E302V, S305Q, V306F, K307H, Q308R, Q308V, Q308W, Q308Y, A309T, A309V, A312T, 및 V313I

[0529] 적합성 +를 갖는 변이체:

[0530] I001A, I001H, I001W, I001Y, G003Y, T004A, T004N, S005H, S005L, V007L, V009L, V009T, R011Y, Q017C, Q017R, Q017V, N019L, N019Y, T026W, Y027A, Q031I, N033K, F040W, S053K, S053R, A056H, A056I, A056Y, D057K, A058N, A058Y, Q061R, Q061W, F063Y, Y075A, V079A, V079N, T080D, N086Y, V087P, N089L, N089M, D094T, A098Y, V104A, S107K, S107Y, Q108A, G109A, G109L, Y110L, S118C, T129E, I131Y, G135A, I137A, A141C, T149A, T149L, D150A, D150F, D150K, D150N, D150Q, D150T, D150V, T152L, T152M, I156M, I156T, Q158L, Q158R, Q158Y, E160L, E160Y, T174A, L175H, N181A, K182L, E187L, I188L, I197A, I197H, I197N, M205A, M205V, S206A, S206C, S206K, S206L, D207A, G212Y, D213L, H216R, S218F, T224F, T224L, T224P, T224Q, T224V, T224Y, N227D, N227L, N227Y, I236A, I237N, N238L, N238M, K239A, A241L, A241S, Q246L, T249L, T249Y, H250K, H250M, H250N, H250P, H250Q, H250R, H250V, H250Y, V253I, V253R, V253Y, S254K, S254L, V255A, V255Y, V256K, D261P, D261V, D261W, K262A, Y268A, Y268S, R269V, T272P, T272Y, Q273C, Q273S, Q273W, Y274A, T278K, T278R, T278Y, N280G, N280Q, S282R, Q283K, Q283L, Q283P, Q283R, Q283W, Q283Y, A287K, A287R, A287T, Q290Y, S291I, S291L, S291M, S291N, D294A, D294V, Y296L, Y296R, T299P, S300I, S300L, Q301L, E302K, E302L, F310A, A312L, A312N, A312R, V313A, V313G, 및 V313L

[0531] 표 4.2는 써몰리신에서의 활성 조합가능한 변이체를 나타낸다. 위치는 서열 번호 3에 열거된 성숙 써몰리신 단백질에 기초하여 번호가 매겨진다.

POS	변이체
17	E,F,P
19	A,D,H,I,R,T,V
24	F,H
25	H
31	L
33	Q
40	C
48	A,R
73	Y
79	C
80	C,R
81	H
85	C,M,Y
86	V
89	K,R,T,V
94	E
109	D
117	A,K,R,T
140	S
141	T
150	E,M,W
151	A,C,E,I
152	D
153	V
156	H,R
158	F,G,I,V
159	F,I,K
160	S
161	Y
168	N
171	D
174	S,V
175	C,E,F,G,I
176	E,Q
178	C,M
180	L,W
181	Y
182	F,R
183	H,I,L,M,Q,R,T
189	C
205	C,F

[0532]

206	F,H,I,T,V,Y
207	T
210	A,E,F,G,H,T
212	F,H,K,M,N,R,S,T
213	I,K,R,V,Y
214	Q
218	R
223	Y
224	I,R
227	C,E,G,K,Q,R,S,T,V
235	D,L,T
236	P
237	A,Q
238	A,C,D,E,R,S
239	C,G,H,L,Q,R,S,V,Y
241	E,F,G,I,T,V
244	Q
246	K,R
248	C,H
249	G,V
250	F,S
251	H
252	F,I,L
253	A,D,E,P
254	C,F,G,H,I,P
255	F,Q
258	F
259	I
260	C,D,I
261	K,R,T
262	C,F,H,L,P,R
266	W
268	F,R
269	P,T,W,Y
270	M,N,P,V
271	V
272	R
273	R
274	D,E
276	G,S
278	V
279	E
280	P,R,V
282	P
283	A,C,E,G,H,T,V
294	T
295	R
296	E,I
297	I,V
300	Q
302	W
306	Y
310	I,N
312	Q

[0533]

써몰리신의 선택된 생산 위치 번이체를 추가로 열거한다. 위치는 서열 번호 3에 열거된 성숙 써몰리신 단백질에 기초하여 번호가 매겨진다. T002I, T002M, T048E, A058L, F063C, V087L, N096H, Q128Y, Y151R, A180E, S198A, I244T, Q273N, P277R, T278R, Q283E, T293L, T293N, L295F, S298A, Q301I, N019D, S025A, T026R, T049K, T049Q, F063L, S065A, S065T, L091M, N096Q, N096R, N096Y, N097K, R101M, G109A, S118A, I131L, V140D, Q158A, N159E, N159K, L175V, A180R, G196H, G196T, G196Y, K219S, Q225E, I232R, I244L, Q246D, D261N, P277G, T293Y, S300G, Q301F, Q301M, V303R, S305A, D311A.

[0535]

실시예 5

써몰리신 상동체의 동정

A. 프로테아제의 MEROPS 데이터베이스에서의 관련 분자의 동정

[0538]

바실러스 써모프로테올리티쿠스의 써몰리신은 MEROPS 프로테아제 데이터베이스 (<http://merops.sanger.ac.uk>)에서 패밀리 M4 (메탈로프로테아제에 대한 M)로 분류된다. 써몰리신은 메탈로프로테아제의 M4 패밀리 (써몰리신 패밀리)에 대한 프로토타입, 및 클랜 MA의 유형-예이다. 제3의 아연 리간드가 글루타메이트이기 때문에, 이것은 Glu-진신(Zincin)으로도 알려져 있는 서브클랜 MA(E)로 추가로 분류된다. 바실러스 써모프로테올리티쿠스의

써몰리신은 Merops 수탁 번호 MER001026을 가졌다.

[0539]

MEROPS 데이터베이스는 웹티다제 (프로테아제)의 계층적, 구조-기반 분류를 사용한다. 여기서, 각각의 웹티다제는 아미노산 서열의 통계적으로 유의미한 유사성에 기초하여 패밀리에 할당되며, 상동성인 것으로 생각되는 패밀리들은 클랜으로 함께 그룹화된다. 분자 구조 및 상동성에 의한 웹티다제의 분류는 1990년대에 개발되었는데, 그 당시에 실현된 다수의 아미노산 서열 및 3차원 구조에 대한 데이터의 이용가능성에 의존하기 때문이다. 1993년에, 롤링스(Rawlings) & 바렛(Barrett)는 개별 웹티다제들을 패밀리에 할당하고 패밀리들을 클랜으로 그룹화하는 시스템을 설명하였다 (문헌[Rawlings, N.D. & Barrett, A.J. (1993) Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* 290, 205-218]).

[0540]

M4 패밀리 내의 모든 웹티다제는 단일의, 촉매 아연 이온과 결합한다. 메탈로웹티다제의 다수의 다른 패밀리에 서와 같이, 히스티딘이 아연 리간드이고 글루타메이트가 활성 부위 잔기인 HEXXH 모티프(motif)가 존재한다. 이러한 패밀리의 대부분의 구성원은 중성 pH에서 활성인 엔도펩티다제이고, 거의 배타적으로 박테리아로부터의 것이며, 열 안정성은 칼슘 이온의 결합 때문이었다. 단백질 및 웹티드는 Xaa+Yaa의 절단에 대한 선호성을 가지고 분해되는데, Xaa는 소수성 잔기이고 Yaa는 Leu, Phe, Ile, 또는 Val이다. 써몰리신은 도메인들 사이에 활성 부위를 갖는 2-도메인 구조를 갖는다. N-말단 도메인은 2개의 나선을 갖는 구별되는 6-가닥 베타 시트를 포함하며, 그 중 하나는 HEXXH 아연-결합 모티프를 지닌다. 이 패밀리에 대해 고유한, C-말단 도메인은 주로 나선 형이며 제3 아연 리간드를 지닌다.

[0541]

MEROPS (버전 9.5) 내의 성숙 써몰리신 단백질 (서열 번호 3)의 상동체에 대한 BLAST 검색은 하기에 나타낸 결과를 산출한다 (표 5.1). 각각의 효소는 MEROPS 데이터베이스의 고유한 수탁 번호, 유전자 기원에 의해 열거되며, 프로그램에 의해 계산되는 퍼센트 동일성을 나타낸다.

[0542] [표 5.1]

썩물리신을 포함하는, 메탈로프로테아제의 M4 페밀리의 구성원들에 대한, MEROP 데이터베이스 출력.

MEROPS ID #	기원	% ID
MER001026	- 썩물리신(바실러스 썩모프로테올리티쿠스)	100.00%
MER001027	- 썩물리신(제오바실러스 스테아로썩모필루스)	100.00%
MER212338	- 썩물리신(제오바실러스 종 C56-T3)	87.13%
MER168133	- 썩물리신(제오바실러스 종 Y412MC61)	87.13%
MER001353	- 썩물리신(알리사이클로바실러스 아시도칼다리우스(Alicyclobacillus acidocaldarius))	86.13
MER001927	- 썩물리신(바실러스 종)	87.13
MER234417	- 썩물리신(제오바실러스 종 Y412MC52)	87.13%
MER001034	- 썩물리신(바실러스 칼돌리티쿠스(Bacillus caldolyticus))	86.80
MER001025	- 스테아로리신(제오바실러스 스테아로썩모필루스)	86.14
MER040474	- 썩물리신(제오바실러스 카우스토필루스(Geobacillus kaustophilus))	87.76%
MER109364	- 스테아로리신(바실러스 종 SG-1)	74.75%
MER187808	- 썩물리신(바실러스 세레우스(Bacillus cereus))	73.42%
MER176709	- 썩물리신(바실러스 슈도마이코이데스(Bacillus pseudomycoides))	73.75%
MER003181	- 썩물리신(바실러스 썩린지엔시스)	73.75%
MER061817	- 썩물리신(바실러스 세레우스)	73.42%
MER001031	- 썩물리신(바실러스 메가테리움)	73.18%
MER001030	- 썩물리신(바실러스 세레우스)	73.75%
MER001354	- 썩물리신(락토바실러스 종)	72.76%
MER187798	- 썩물리신(바실러스 마이코이데스(Bacillus mycoides))	73.75%
MER187790	- 썩물리신(바실러스 슈도마이코이데스)	72.76%
MER021824	- 썩물리신(바실러스 안트라시스(Bacillus anthracis))	72.76%
MER109427	- 썩물리신(바실러스 종 SG-1)	72.88%
MER109389	- 썩물리신(바실러스 바이헨슈테파넨시스(Bacillus weihenstephanensis))	73.42%
MER187794	- 썩물리신(바실러스 마이코이데스)	72.43%
MER091675	- 썩물리신(에시구오박테리움 시비리쿰(Exiguobacterium sibiricum))	70.61%
MER124526	- 썩물리신(에시구오박테리움 종 AT1b)	68.90%
MER001028	- 썩물리신(브레비바실러스 브레비스)	67.55%
MER169677	- 썩물리신(브레비바실러스 브레비스)	63.04%
MER187793	- 썩물리신(바실러스 슈도마이코이데스)	61.24%
MER187797	- 썩물리신(바실러스 마이코이데스)	60.91%
MER187765	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제(파에니바실러스 라바이(Paenibacillus larvae))	59.67%
MER001033	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제(파에니바실러스 폴리믹사(Paenibacillus polymyxa))	56.62%
MER001029	- 중성 펩티다제 B(바실러스 서브틸리스)	54.05%
MER187796	- 중성 펩티다제 B(바실러스 마이코이데스)	55.26%
MER187792	- 중성 펩티다제 B(바실러스 슈도마이코이데스)	55.26%
MER038281	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제(바실러스 비에트나멘시스 (Bacillus vietnamensis))	57.89%
MER091650	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제(헤르페토시폰 아우란티아쿠스 (Herpetosiphon aurantiacus))	56.90%
MER084165	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제(바실러스 세레우스)	55.59%
MER187771	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제(바실러스 코아후일렌시스(Bacillus coahuilensis))	57.05%
MER151875	- 중성 펩티다제 B(바실러스 세레우스)	54.93%
MER187800	- 중성 펩티다제 B(바실러스 마이코이데스)	53.95%
MER028887	- 중성 펩티다제 B(바실러스 세레우스)	54.05%
MER084215	- 중성 펩티다제 B(바실러스 마이헨슈테파넨시스)	53.62%
MER187810	- 중성 펩티다제 B(바실러스 세레우스)	53.95%
MER039810	- 중성 펩티다제 B(바실러스 썩린지엔시스)	54.28%
MER062589	M4 미할당 펩티다제(바실러스 종 NRRL B-14911)	56.62%

[0543]

MER021804	- 중성 펩티다제 B (바실러스 안트라시스)	54.61%
MER109478	- M4 미할당 펩티다제 (바실러스 종 SG-1)	55.45%
MER187779	- 중성 펩티다제 B (바실러스 씨린지 엔시스)	52.98%
MER187806	- 중성 펩티다제 B (바실러스 세레우스)	52.63%
MER168882	- 썬볼리신 (파에니바실러스 라비에)	53.33%
MER062591	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (바실러스 세레우스)	52.72%
MER187770	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (바실러스 세레우스)	52.40%
MER080987	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (바실러스 씨린지 엔시스)	52.40%
MER187805	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (바실러스 세레우스)	52.55%
MER050323	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (바실러스 세레우스)	53.21%
MER187780	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (바실러스 씨린지 엔시스)	53.21%
MER022038	- 중성 펩티다제 B (오세아노바실러스 이해이엔시스 (<i>Oceanobacillus iheyensis</i>))	49.50%
MER187809	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (바실러스 세레우스)	49.05%
MER117663	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (쉬와넬라 할리팍센시스 (<i>Shewanella halifaxensis</i>))	51.03%
MER014937	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (클로스트리듐 아세토부틸리쿰 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>))	48.04%
MER002103	- 람다 톡신 (클로스트리듐 퍼프린젠스 (<i>Clostridium perfringens</i>))	46.86%
MER048471	- 바실로리신 (브레비마실러스 라테로스포루스 (<i>Brevibacillus laterosporus</i>))	49.51
MER001035	- 바실로리신 (바실러스 앤밀로리퀴파시엔스)	49.51%
MER001038	- 바실로리신 (바실러스 종)	49.51%
MER054676	- 바실로리신 (바실러스 종 B16)	49.18%
MER057051	- 아우레올리신 (<i>aureolysin</i>) (스타필로코쿠스 사프로피티쿠스 (<i>Staphylococcus saprophyticus</i>))	47.02%
MER080743	- 바실로리신 (바실러스 종 RH219)	49.66%
MER187789	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (바실러스 씨린지 엔시스)	48.72%
MER003790	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (클로스트리듐 히스톨리티쿰 (<i>Clostridium histolyticum</i>))	47.71%
MER080014	- 바실로리신 (바실러스 서브틸리스)	49.32%
MER001032	- 바실로리신 (바실러스 서브틸리스)	47.37%
MER091634	- 바실로리신 (바실러스 푸밀루스 (<i>Bacillus pumilus</i>))	47.37%
MER014941	- 람다 톡신 (클로스트리듐 아세토부틸리쿰)	45.48%
MER091620	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (플라보박테리움 퀀럼나레 (<i>Flavobacterium columnare</i>))	45.40%
MER155135	- 아우레올리신 (마크로코코스 카세올리티쿠스 (<i>Macrococcus caseolyticus</i>))	48.65%
MER203088	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (쉬와넬라 비울라세아 (<i>Shewanella violacea</i>))	49.82%
MER086404	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (스티그마넬라 아우란티아카 (<i>Stigmatella aurantiaca</i>))	45.11%
MER068045	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (믹소코쿠스 잔투스 (<i>Myxococcus xanthus</i>))	45.39%
MER187787	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (바실러스 씨린지 엔시스)	58.88%
MER251173	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (믹소코쿠스 풀부스 (<i>Myxococcus fulvus</i>))	45.39%
MER091640	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (스티그마넬라 아우란티아카)	48.43%
MER086488	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (스티그마넬라 아우란티아카)	44.44%
MER025442	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (비브리오 불니피쿠스 (<i>Vibrio vulnificus</i>))	46.49%
MER001869	- 아우레올리신 (스타필로코쿠스 에피더미디스 (<i>Staphylococcus epidermidis</i>))	46.13%
MER178903	- 아우레올리신 (스타필로코쿠스 카피티스 (<i>Staphylococcus capitis</i>))	47.47%
MER017697	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (메타노사르시나 아세티보란스 (<i>Methanosarcina acetivorans</i>))	44.14%
MER062832	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (플라보박테리움 존슨니아에 (<i>Flavobacterium johnsoniae</i>))	45.71%
MER187814	- 아우레올리신 (스타필로코쿠스 와르네리 (<i>Staphylococcus warneri</i>))	45.21%
MER004711	- 아우레올리신 (스타필로코쿠스 아우레우스 (<i>Staphylococcus aureus</i>))	46.28%
MER229315	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (비브리오 미미쿠스 (<i>Vibrio mimicus</i>))	44.15%
MER011075	- 아우레올리신 (스타필로코쿠스 크로모게네스 (<i>Staphylococcus chromogenes</i>))	43.00%
MER179736	- 아우레올리신 (스타필로코쿠스 슈딘테르데우스 (<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>))	45.83%
MER187776	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (크리세오박테리움 글레움 (<i>Chryseobacterium gleum</i>)))	42.81%
MER068475	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (믹소코쿠스 잔투스)	43.84%
MER063156	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (슈도알테로모나스 투니카타 (<i>Pseudoalteromonas tunicata</i>))	46.56%
MER252532	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (믹소코쿠스 풀부스)	46.32%
MER091643	- 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (스티그마넬라 아우란티아카)]	45.64%

[0544]

[0545]

계통수의 생성과 같은, MEROPS 데이터베이스 내의 다양한 페밀리의 구성원의 추가적인 분석을 수행할 수 있다. 페밀리 M4 계통수의 424개의 구성원의 구조 (http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/famwrap/famcards/trees/m4_tree.htm)가 하기에 제공되어 있다 (도 2a 내지 도 2c).

[0546]

도 2에서 상기에 나타낸 계통수 페밀리 M4의 서열 및 구조에 대한 중요 사항

[0547]

PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C

[0548]

1 스티그마넬라 아우란티아카) 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (MER086404)

[0549]

P_프로단백질~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C

[0550]

2 (스티그마넬라 아우란티아카) 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (MER086488)

[0551]

3 (믹소코쿠스 잔투스) 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (MER068045)

[0552]

펩티다제_M4~펩티다제_M4_C~PPC~PPC

[0553]

4 (슈도알테로모나스 투니카타) 페밀리 M4 미할당 펩티다제 (MER063156)

펩티다제_M4~펩티다제_M4_C

[0555] 5 M04.017 (스트렙토마이세스 아베르미틸리스(*Streptomyces avermitilis*)) 그리셀리신(griselysin) (MER028561)

[0556] 6 M04.017 (스트렙토마이세스 스비세우스(*Streptomyces sviceus*)) 그리셀리신 (MER144000)

[0557] 7 M04.017 (스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(*Streptomyces viridochromogenes*)) 그리셀리신 (MER229668)

[0558] 8 M04.017 (스트렙토마이세스 코엘리콜로르(*Streptomyces coelicolor*)) 그리셀리신 (MER012275)

[0559] 9 M04.017 (스트렙토마이세스 스카비에이(*Streptomyces scabiei*)) 그리셀리신 (MER200776)

[0560] 10 M04.017 (크리벨라 플라비다(*Kribbella flava*)) 그리셀리신 (MER076577)

[0561] 11 M04.017 (자니박터 종 HTCC2649) 그리셀리신 (MER119370)

[0562] 12 M04.017 (노카르디오이데스 종 JS614) 그리셀리신 (MER075575)

PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C

[0564] 13 M04.017 (스티그마텔라 아우란티아카) 그리셀리신 (MER086497)

[0565] 14 M04.017 (산토모나스 캄페스트리스(*Xanthomonas campestris*)) 그리셀리신 (MER070193)

[0566] 15 M04.017 (산토모나스 악소노포디스(*Xanthomonas axonopodis*)) 그리셀리신 (XAC0465 단백질) (MER019560)

[0567] 16 M04.017 (산토모나스 오리재(*Xanthomonas oryzae*)) 그리셀리신 (MER113870)

[0568] 17 M04.017 (마이크로모노스포라 종 L5) 그리셀리신 (MER230635)

[0569] 18 M04.017 (스트렙토마이세스 아베르미틸리스) 그리셀리신 (SAV1037 단백질) (MER028563)

[0570] 19 M04.017 (스트렙토마이세스 스비세우스) 그리셀리신 (MER187827)

펩티다제_M4~펩티다제_M4_C

[0572] 20 M04.017 (스트렙토마이세스 프리스티나에스피랄리스(*Streptomyces pristinaespiralis*)) 그리셀리신 (MER137080)

[0573] 21 M04.017 (스트렙토마이세스 종 SPB74) 그리셀리신 (MER163965)

[0574] 22 M04.017 (스트렙토마이세스 알부스(*Streptomyces albus*)) 그리셀리신 (MER187823)

[0575] 23 M04.017 (스트렙토마이세스 아베르미틸리스) 그리셀리신 (SAV2795 단백질) (MER028566)

[0576] 24 M04.017 (스트렙토마이세스 스비세우스) 그리셀리신 (MER137175)

[0577] 25 M04.017 (스트렙토마이세스 가나엔시스(*Streptomyces ghanaensis*)) 그리셀리신 (MER187817)

[0578] 26 M04.017 (스트렙토마이세스 코엘리콜로르) 그리셀리신 (MER019351)

PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C

[0580] 27 M04.017 (스트렙토마이세스 스카비에이) 그리셀리신 (MER200969)

펩티다제_M4~펩티다제_M4_C~P_프로단백질

[0582] 28 M04.017 (스트렙토마이세스 종 SPB74) 그리셀리신 (MER137964)

[0583] 29 M04.017 (스트렙토마이세스 스비세우스) 그리셀리신 (MER187826)

펩티다제_M4~펩티다제_M4_C~He_PIG

[0585] 30 M04.017 (스트렙토마이세스 아베르미틸리스) 그리셀리신 (MER028567)

펩티다제_M4~펩티다제_M4_C

[0587] 31 M04.017 (스트렙토마이세스 셈타투스(*Streptomyces septatus*)) 그리셀리신 (MER108931)

- [0588] 32 M04.017 (스트렙토마이세스 스카비에이) 그리셀리신 (MER200878)
- [0589] 33 M04.017 (스트렙토마이세스 종 Mg1) 그리셀리신 (MER180683)
- [0590] 34 M04.017 (스트렙토마이세스 스비세우스) 그리셀리신 (MER187825)
- [0591] 웨티다제_M4~웨티다제_M4_C~P_프로단백질
- [0592] 35 M04.017 (스트렙토마이세스 코엘리콜로르) 그리셀리신 (MER011085)
- [0593] 36 M04.017 (스트렙토마이세스 스카비에이) 그리셀리신 (MER200968)
- [0594] 37 M04.017 (스트렙토마이세스 가나엔시스) 그리셀리신 (MER187816)
- [0595] 38 M04.017 (스트렙토마이세스 그리세우스(*Streptomyces griseus*)) 그리셀리신 (MER004744)
- [0596] 39 M04.017 (스트렙토마이세스 필라멘토수스(*Streptomyces filamentosus*)) 그리셀리신 (MER187821)
- [0597] 40 M04.017 (스트렙토마이세스 아베르미틸리스) 그리셀리신 (MER028565)
- [0598] 41 M04.017 (스트렙토마이세스 종 Mg1) 그리셀리신 (MER163416)
- [0599] 웨티다제_M4~웨티다제_M4_C
- [0600] 42 M04.017 (스트렙토마이세스 그리세우스) 그리셀리신 (MER121393)
- [0601] 43 M04.017 (스트렙토마이세스 필라멘토수스) 그리셀리신 (MER187820)
- [0602] 44 M04.017 (스트렙토마이세스 종 TH-3) 그리셀리신 (MER169964)
- [0603] PepSY~웨티다제_M4~웨티다제_M4_C
- [0604] 45 M04.017 (자니박터 종 HTCC2649) 그리셀리신 (MER109443)
- [0605] 46 M04.017 (자니박터 종 HTCC2649) 그리셀리신 (MER109417)
- [0606] 47 M04.017 (크리밸라 플라비다) 그리셀리신 (MER096497)
- [0607] 48 M04.017 (스트렙토마이세스 아베르미틸리스) 그리셀리신 (MER028564)
- [0608] 49 M04.022 (부르크홀데리아 슈도말레이(*Burkholderia pseudomallei*)) ZmpA 웨티다제 (MER029961)
- [0609] 50 M04.022 (부르크홀데리아 말레이(*Burkholderia mallei*)) ZmpA 웨티다제 (MER040142)
- [0610] 51 M04.022 (부르크홀데리아 타일란덴시스(*Burkholderia thailandensis*)) ZmpA 웨티다제 (MER058477)
- [0611] 52 M04.022 (부르크홀데리아 오클라호멘시스(*Burkholderia oklahomensis*)) ZmpA 웨티다제 (MER187766)
- [0612] 53 M04.022 (부르크홀데리아 세노세파시아(*Burkholderia cenocepacia*)) ZmpA 웨티다제 (MER050804)
- [0613] 54 M04.022 (부르크홀데리아 세파시아(*Burkholderia cepacia*)) ZmpA 웨티다제 (MER028622)
- [0614] 55 M04.022 (부르크홀데리아 암비파리아(*Burkholderia ambifaria*)) ZmpA 웨티다제 (MER055697)
- [0615] 56 M04.022 (부르크홀데리아 종 383) ZmpA 웨티다제 (MER056816)
- [0616] 57 M04.022 (부르크홀데리아 우보넨시스(*Burkholderia ubonensis*)) ZmpA 웨티다제. (MER166266)
- [0617] 58 (데할로코코이데스 종 VS) M4 미활당 웨티다제 (MER109883)
- [0618] 59 (미확인 유박테리움(*eubacterium*) SCB49) M4 미활당 웨티다제 (MER137229)
- [0619] 60 (크로세이박터 아틀란티쿠스(*Croceibacter atlanticus*)) M4 미활당 웨티다제 (MER118340)
- [0620] PepSY~웨티다제_M4~웨티다제_M4_C~fn3
- [0621] 61 (플라보박테리움 존슨니아에) M4 미활당 웨티다제 (MER062832)
- [0622] 62 (플라보박테리움 콜럼나레) M4 미활당 웨티다제 (MER091620)
- [0623] 웨티다제_M4~웨티다제_M4_C

- [0624] 63 (크로세이박터 아틀란티쿠스) M4 미활당 웨티다제 (MER109847)
- [0625] 64 (크리세오박테리움 글레움) M4 미활당 웨티다제 (MER187776)
- [0626] 65 (코르디아 알기시다(*Kordia algicida*)) M4 미활당 웨티다제 (MER166403)
- [0627] **PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C~MAM**
- [0628] 66 (마이크로실라 마리나(*Microscilla marina*)) M4 미활당 웨티다제 (MER091624)
- [0629] 67 (크로세이박터 아틀란티쿠스) M4 미활당 웨티다제 (MER117388)
- [0630] 68 (크로세이박터 아틀란티쿠스) M4 미활당 웨티다제 (MER138802)
- [0631] 69 (파에니바실러스 라바에) M4 미활당 웨티다제 (MER187765)
- [0632] 70 M04.001 (파에니바실러스 라바에) 써몰리신 (MER168882)
- [0633] **펩티다제_M4~펩티다제_M4_C**
- [0634] 71 (파에니바실러스 폴리믹사) M4 미활당 웨티다제 (MER001033)
- [0635] **PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C**
- [0636] 72 M04.001 (브레비바실러스 브레비스) 써몰리신 (MER001028)
- [0637] 73 M04.001 (브레비바실러스 브레비스) 써몰리신 (npr 단백질) (MER169677)
- [0638] 74 M04.001 (바실러스 슈도마이코이데스) 써몰리신 (MER187790)
- [0639] 75 M04.001 (바실러스 마이코이데스) 써몰리신 (MER187794)
- [0640] 76 M04.001 (바실러스 세레우스) 써몰리신 (MER061817)
- [0641] 77 M04.001 (바실러스 세레우스) 써몰리신 (MER187808)
- [0642] 78 M04.001 (바실러스 바이헨슈테파네시스) 써몰리신 (MER109389)
- [0643] 79 M04.001 (바실러스 마이코이데스) 써몰리신 (MER187798)
- [0644] 80 M04.001 (바실러스 세레우스) 써몰리신 (MER001030)
- [0645] 81 M04.001 (바실러스 써린지에시스) 써몰리신 (MER003181)
- [0646] 82 M04.001 (바실러스 슈도마이코이데스) 써몰리신 (MER176709)
- [0647] 83 M04.001 (락토바실러스 종) 써몰리신 (MER001354)
- [0648] 84 M04.001 (바실러스 안트라시스) 써몰리신 (MER021824)
- [0649] 85 M04.001 (바실러스 메가테리움) 써몰리신 (MER001031)
- [0650] 86 M04.001 (바실러스 종 SG-1) 써몰리신 (MER109427)
- [0651] 87 M04.001 (바실러스 칼돌리티쿠스) 써몰리신 (MER001034)
- [0652] 88 M04.018 (제오바실러스 스테아로써모필루스) 스테아로리신 (MER001025)
- [0653] 89 M04.001 (제오바실러스 종 Y412MC52) 써몰리신 (MER234417)
- [0654] 90 M04.001 (알리사이클로바실러스 아시도칼다리우스) 써몰리신 (MER001353)
- [0655] 91 M04.001 (바실러스 종) 써몰리신 (MER001927)
- [0656] 92 M04.001 (제오바실러스 종 Y412MC61) 써몰리신 (MER168133)
- [0657] 93 M04.001 (제오바실러스 종 C56-T3) 써몰리신 (MER212338)
- [0658] 94 M04.001 (제오바실러스 카우스토필루스) 써몰리신 (MER040474)
- [0659] 95 M04.001 (바실러스 써모프로테올리티쿠스) 써몰리신 (MER001026)

- [0660] 96 M04.001 (제오바실러스 스테아로씨모필루스) 써몰리신 (MER001027)
- [0661] 97 M04.018 (바실러스 종 SG-1) 스테아로리신 (MER109364)
- [0662] 98 M04.001 (엑시구오박테리움 시비리쿰) 써몰리신 (MER091675)
- [0663] 99 M04.001 (엑시구오박테리움 종 AT1b) 써몰리신 (MER124526)
- [0664] 100 M04.001 (바실러스 마이코이데스) 써몰리신 (MER187797)
- [0665] 101 M04.001 (바실러스 슈도마이코이데스) 써몰리신 (MER187793)
- [0666] 102 (바실러스 써린지엔시스) M4 미활당 웨티다제 (MER187787)
- [0667] 103 M04.012 (바실러스 써린지엔시스) 중성 웨티다제 B (MER039810)
- [0668] 104 M04.012 (바실러스 세레우스) 중성 웨티다제 B (MER028887)
- [0669] 105 M04.012 (바실러스 바이헨슈테파넨시스) 중성 웨티다제 B (MER084215)
- [0670] 106 M04.012 (바실러스 마이코이데스) 중성 웨티다제 B (MER187800)
- [0671] 107 M04.012 (바실러스 세레우스) 중성 웨티다제 B (MER151875)
- [0672] 108 M04.012 (바실러스 안트라시스) 중성 웨티다제 B (MER021804)
- [0673] 109 M04.012 (바실러스 슈도마이코이데스) 중성 웨티다제 B (MER187792)
- [0674] 110 M04.012 (바실러스 마이코이데스) 중성 웨티다제 B (MER187796)
- [0675] 111 (바실러스 세레우스) M4 미활당 웨티다제 (MER084165)
- [0676] 112 M04.012 (바실러스 세레우스) 중성 웨티다제 B (MER187810)
- [0677] 113 M04.012 (바실러스 세레우스) 중성 웨티다제 B (MER187806)
- [0678] 114 M04.012 (바실러스 써린지엔시스) 중성 웨티다제 B (MER187779)
- [0679] 115 M04.012 (오세아노바실러스 이헤이엔시스) 중성 웨티다제 B (MER022038)
- [0680] 116 M04.012 (바실러스 서브틸리스) 중성 웨티다제 B (MER001029)
- [0681] 웨티다제_M4~웨티다제_M4_C
- [0682] 117 (헤르페토시폰 아우란티아쿠스) M4 미활당 웨티다제 (MER091650)
- [0683] 118 (바실러스 세레우스) M4 미활당 웨티다제 (MER187809)
- [0684] PepSY~웨티다제_M4~웨티다제_M4_C
- [0685] 119 M04.009 (스타필로코쿠스 에피데미디스) 아우레올리신 (MER001869)
- [0686] 120 M04.009 (스타필로코쿠스 카페티스) 아우레올리신 (MER178903)
- [0687] 121 M04.009 (스타필로코쿠스 아우레우스) 아우레올리신 (MER004711)
- [0688] 122 M04.009 (마크로코쿠스 카세올리티쿠스) 아우레올리신 (MER155135)
- [0689] 123 M04.009 (스타필로코쿠스 슈딘테르메디우스) 아우레올리신 (MER179736)
- [0690] 124 M04.009 (스타필로코쿠스 와르네리) 아우레올리신 (MER187814)
- [0691] 125 M04.009 (스타필로코쿠스 크로모게네스) 아우레올리신 (MER011075)
- [0692] 126 M04.009 (스타필로코쿠스 사프로피티쿠스) 아우레올리신 (MER057051)
- [0693] 127 (바실러스 세레우스) M4 미활당 웨티다제 (MER050323)
- [0694] 128 (바실러스 써린지엔시스 M4 미활당 웨티다제 (MER187780)
- [0695] 129 (바실러스 세레우스) 미활당 웨티다제 (MER062591)

- [0696] 130 (바실러스 세레우스) M4 미활당 웨티다제 ([MER187770](#))
- [0697] 131 (바실러스 써린지엔시스) M4 미활당 웨티다제 ([MER080987](#))
- [0698] 132 (바실러스 세레우스 M4 미활당 웨티다제 ([MER187805](#))
- [0699] 133 (바실러스 써린지엔시스) M4 미활당 웨티다제 ([MER187789](#))
- [0700] 134 (바실러스 비에트나멘시스) M4 미활당 웨티다제 ([MER038281](#))
- [0701] 135 (바실러스 종 NRRL B-14911) M4 미활당 웨티다제 ([MER062589](#))
- [0702] 136 (바실러스 종 SG-1) M4 미활당 웨티다제 ([MER109478](#))
- [0703] 137 (바실러스 코아후일렌시스) M4 미활당 웨티다제 ([MER187771](#))
- [0704] *PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C~PPC*
- [0705] 138 M04.021 (썩모악티노마이세스 종 27a) 중성 웨티다제 ([MER029719](#))
- [0706] *PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C*
- [0707] 139 M04.014 (바실러스 서브틸리스) 바실로리신 ([MER080014](#))
- [0708] 140 M04.014 (바실러스 종 RH219) 바실로리신 ([MER080743](#))
- [0709] 141 M04.014 (바실러스 종 B16) 바실로리신 ([MER054676](#))
- [0710] *펩티다제_M4~펩티다제_M4_C*
- [0711] 142 M04.014 (브레비바실러스 라테로스포루스) 바실로리신 ([MER048471](#))
- [0712] *PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C*
- [0713] 143 M04.014 (바실러스 아밀로리퀴파시엔스) 바실로리신 ([MER001035](#))
- [0714] 144 M04.014 (바실러스 종) 바실로리신 ([MER001038](#))
- [0715] *펩티다제_M4~펩티다제_M4_C*
- [0716] 145 M04.014 (바실러스 푸밀루스) 바실로리신 ([MER091634](#))
- [0717] *PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C*
- [0718] 146 M04.014 (바실러스 서브틸리스) 바실로리신 ([MER001032](#))
- [0719] 147 (클로스트리듐 아세토부틸리쿰) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER014937](#))
- [0720] 148 M04.011 (클로스트리듐 퍼프린젠스) 람다 톡신 ([MER002103](#))
- [0721] 149 M04.011 (클로스트리듐 아세토부틸리쿰) 람다 톡신 ([MER014941](#))
- [0722] 150 (클로스트리듐 히스톨리티쿰) M4 미활당 웨티다제 ([MER003790](#))
- [0723] *펩티다제_M4~펩티다제_M4_C~PPC*
- [0724] 151 (클로로플렉서스 아우란티아쿠스) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER001453](#))
- [0725] 152 (클로로플렉서스 종 Y-400-f1) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER155497](#))
- [0726] 153 M04.008 (리스테리아 인노쿠아(*Listeria innocua*)) Mp1 웨티다제 (리스테리아 종) ([MER229925](#))
- [0727] *PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C*
- [0728] 154 M04.008 (리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*)) Mp1 웨티다제 ([MER001047](#))
- [0729] 155 M04.008 (리스테리아 이바노비(*Listeria ivanovii*)) Mp1 웨티다제 ([MER045739](#))
- [0730] 156 M04.008 (리스테리아 세엘리게리(*Listeria seeligeri*)) Mp1 웨티다제 ([MER045740](#))
- [0731] 157 (플레시오시스티스 파시피카(*Plesiocystis pacifica*)) M4 미활당 웨티다제 ([MER160603](#))

[0732] **펩티다제_M4~펩티다제_M4_C~PPC~PPC**158 (스티그마텔라 아우란티아카) M4 미활당 펩티다제 (MER091643)159 (스티그마텔라 아우란티아카) M4 미활당 펩티다제 (MER091640)[0735] **펩티다제_M4~펩티다제_M4_C**160 (믹소코쿠스 잔투스) M4 미활당 펩티다제 (MER068475)[0737] **펩티다제_M4~펩티다제_M4_C~PPC~PPC**161 (믹소코쿠스 잔투스) M4 미활당 펩티다제 (MER017624)[0739] **펩티다제_M4~펩티다제_M4_C**162 (шу와넬라 할리파센시스) M4 미활당 펩티다제 (MER117663)163 (шу와넬라 비올라세아) M4 미활당 펩티다제 (MER203088)164 (할리스코메노박터 하이드로스시스 Haliscomenobacter hydrossis) M4 미활당 펩티다제 (MER248570)165 (사이토파가 허치소니 Cytophaga hutchinsonii) M4 미활당 펩티다제 (MER023927)166 (비브리오 미미쿠스) M4 미활당 펩티다제 (MER229315)[0745] **펩티다제_M4~펩티다제_M4_C**167 (비브리오 불니피쿠스) M4 미활당 펩티다제 (MER025442)168 (반실러스 세레우스) M4 미활당 펩티다제 (MER187802)169 (반실러스 세레우스) M4 미활당 펩티다제 (MER091678)170 (반실러스 안트라시스) M4 미활당 펩티다제 (MER019065)171 (반실러스 세레우스) M4 미활당 펩티다제 (MER054507)172 (반실러스 써린지엔시스) M4 미활당 펩티다제 (MER039813)173 (반실러스 세레우스) M4 미활당 펩티다제 (MER187804)174 (반실러스 써린지엔시스) M4 미활당 펩티다제 (MER091674)[0754] **PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C~Big_3~Gram_pos_앵커(anchor)**175 (반실러스 세레우스) M4 미활당 펩티다제 (MER028889)176 (반실러스 써린지엔시스) M4 미활당 펩티다제 (MER039811)177 (반실러스 세레우스) M4 미활당 펩티다제 (MER028890)178 (반실러스 안트라시스) M4 미활당 펩티다제 (MER020840)179 (반실러스 마이코이데스) M4 미활당 펩티다제 (MER187799)180 (반실러스 바이헨슈테파넨시스) M4 미활당 펩티다제 (MER109684)181 (반실러스 슈도마이코이데스) M4 미활당 펩티다제 (MER187791)182 (반실러스 마이코이데스) M4 미활당 펩티다제 (MER187795)183 (반실러스 마이코이데스) M4 미활당 펩티다제 (MER187801)184 (반실러스 써린지엔시스) M4 미활당 펩티다제 (MER039814)[0765] **펩티다제_M4~펩티다제_M4_C**185 (반실러스 세레우스) M4 미활당 펩티다제 (MER028888)186 (반실러스 안트라시스) M4 미활당 펩티다제 (MER020835)

- [0768] 187 (하렐라 제주엔시스(*Haella chejuensis*)) M4 미활당 웨티다제 ([MER058667](#))
- [0769] **PepSY~웨티다제_M4~웨티다제_M4_C**
- [0770] 188 (클로스트리듐 보툴리눔(*Clostridium botulinum*)) M4 미활당 웨티다제 (npr 단백질) ([MER088299](#))
- [0771] **PepSY~웨티다제_M4~웨티다제_M4_C**
- [0772] 189 (클로스트리듐 보툴리눔) M4 미활당 웨티다제 (npr-1 단백질) ([MER079342](#))
- [0773] 190 (클로스트리듐 스포로게네스(*Clostridium sporogenes*)) M4 미활당 웨티다제 ([MER137542](#))
- [0774] 191 (클로스트리듐 보툴리눔) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 (npr 단백질) ([MER187767](#))
- [0775] 192 (클로스트리듐 보툴리눔) M4 미활당 웨티다제 (npr_1 단백질) ([MER187754](#))
- [0776] 193 (클로스트리듐 보툴리눔) M4 미활당 웨티다제 ([MER187753](#))
- [0777] 194 (클로스트리듐 보툴리눔) M4 미활당 웨티다제 ([MER079338](#))
- [0778] 195 (클로스트리듐 스포로게네스) M4 미활당 웨티다제 ([MER144884](#))
- [0779] 196 (클로스트리듐 보툴리눔) M4 미활당 웨티다제 (npr 단백질) ([MER079341](#))
- [0780] 197 (클로스트리듐 스포로게네스) M4 미활당 웨티다제 ([MER187769](#))
- [0781] 198 (클로스트리듐 보툴리눔) M4 미활당 웨티다제 (npr_2 단백질) ([MER187755](#))
- [0782] 199 (클로스트리듐 보툴리눔) M4 미활당 웨티다제 ([MER079340](#))
- [0783] 200 (클로스트리듐 보툴리눔) M4 미활당 웨티다제 (npr-4 단백질) ([MER095317](#))
- [0784] 201 (클로스트리듐 보툴리눔) M4 미활당 웨티다제 (npr-4 단백질) ([MER094802](#))
- [0785] 202 (클로스트리듐 보툴리눔) M4 미활당 웨티다제 (npr 단백질) ([MER094801](#))
- [0786] 203 (클로스트리듐 스포로게네스) M4 미활당 웨티다제 ([MER136684](#))
- [0787] 204 (클로스트리듐 보툴리눔) M4 미활당 웨티다제 (npr 단백질) ([MER079339](#))
- [0788] 205 (클로스트리듐 스포로게네스) M4 미활당 웨티다제 ([MER178275](#))
- [0789] **웨티다제_M4~웨티다제_M4_C~P_프로단백질~P_프로단백질**
- [0790] 206 (메타노사르시나 아세티보라스) M4 미활당 웨티다제 ([MER017697](#))
- [0791] 207 (스트렙토마이세스 가나엔시스) M4 미활당 웨티다제 ([MER187818](#))
- [0792] **웨티다제_M4~웨티다제_M4_C**
- [0793] 208 (스트렙토마이세스 코엘리콜로르) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER011082](#))
- [0794] 209 (스트렙토마이세스 스카비에이) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER200705](#))
- [0795] 210 (스트렙토마이세스 아베르미틸리스) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER028562](#))
- [0796] 211 (스트렙토마이세스 스비세우스) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER137373](#))
- [0797] 212 (스트렙토마이세스 종 Mg1) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER137463](#))
- [0798] 213 (스트렙토마이세스 그리세우스) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER121447](#))
- [0799] 214 (스트렙토마이세스 필라멘토수스) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER187819](#))
- [0800] 215 (스트렙토마이세스 프리스티나에스피랄리스) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER140364](#))
- [0801] 216 (스트렙토마이세스 알부스) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER187822](#))
- [0802] 217 (스트렙토마이세스 종 SPB74) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER163861](#))
- [0803] 218 http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/pepsum?id=M04_UPW (스트렙토마이세스 클라불리게루스(*Streptomyces*

clavuligerus) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER187824](#))

[0804] 219 (아트로박터 클로로페놀리쿠스(*Arthrobacter chlorophenolicus*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER126758](#))

[0805] 220 (아트로박터 페난트레니보란스(*Arthrobacter phenanthrenivorans*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER240183](#))

[0806] 221 (아트로박터 종 FB24) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER050759](#))

[0807] 222 (아트로박터 아우레센스(*Arthrobacter aurescens*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER075195](#))

[0808] 223 (마리네 악티노박테리움(*marine actinobacterium*) PHSC20C1) 패밀리 M4 미활당 웹티다제

[0809] 224 (브라키박테리움 파에시움(*Brachybacterium faecium*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER127552](#))

[0810] 225 (클라비박터 미시가넨시스(*Clavibacter michiganensis*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER121216](#))

[0811] 226 (클라비박터 미시가넨시스) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER115299](#))

[0812] 227 (마이크로박테리움 테스타세움(*Microbacterium testaceum*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER247399](#))

[0813] 228 (인트拉斯포란지움 칼룸(*Intrasporangium calvum*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER231738](#))

[0814] 229 (자니박터 종 HTCC2649) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER115301](#))

[0815] 230 (프란키아 알니(*Frankia alni*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER091651](#))

[0816] 231 (프란키아 종 Cc13) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER051510](#))

[0817] 232 (프란키아 종 EAN1pec) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER051747](#))

[0818] 233 (메이오씨머스 실바누스(*Meiothermus silvanus*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER038269](#))

[0819] 234 (슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER187756](#))

[0820] 235 (믹소코쿠스 잔투스) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER068095](#))

[0821] 236 (부르크홀데리아 종 CCGE1002) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER203878](#))

[0822] 237 (리시누스 콤무니스(*Ricinus communis*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER162821](#))

[0823] 238 (카테놀리스포라 애시디필라(*Catenulispora acidiphila*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER132795](#))

[0824] 239 (브레비박테리움 리넨스(*Brevibacterium linens*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER115300](#))

[0825] 240 (아나바에나 바리아빌리스(*Anabaena variabilis*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER054976](#))

[0826] 241 (노스톡 종 PCC 7120) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER016719](#))

[0827] 242 (노스톡 편크티포르메(*Nostoc punctiforme*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER024259](#))

[0828] 243 (산토모나스 악소노포디스) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER019561](#))

[0829] 244 (산토모나스 캄페스트리스) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER070175](#))

[0830] 245 (산토모나스 오리재) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER027496](#))

[0831] 246 (산토모나스 캄페스트리스) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER019416](#))

[0832] 247 (썩모모노스포라 쿠르바타(*Thermomonospora curvata*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER129229](#))

[0833] 248 (할로모나스 엘론가타(*Halomonas elongata*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER223548](#))

[0834] 249 (크로모할로박터 살렉시겐스(*Chromohalobacter salexigens*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER050897](#))

[0835] 250 (보르데텔라 파라페르투시스(*Bordetella parapertussis*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER030706](#))

[0836] 251 (보르데텔라 브론치셉티카(*Bordetella bronchiseptica*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER030781](#))

[0837] 252 (보르데텔라 페트리(*Bordetella petrii*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER114690](#))

- [0838] 253 (바리오보락스 파라독수스(*Variovorax paradoxus*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER187757](#))
- [0839] 254 (바리오보락스 파라독수스) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER235281](#))
- [0840] 255 (슈도모나스 브라시카세아룸(*Pseudomonas brassicacearum*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER244770](#))
- [0841] 256 (슈도모나스 풀바(*Pseudomonas fulva*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER249215](#))
- [0842] 257 (슈도모나스 스투트제리(*Pseudomonas stutzeri*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER094699](#))
- [0843] 258 (딕케야 다단티(*Dickeya dadantii*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER223843](#))
- [0844] 259 (딕케야 다단티) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER193415](#))
- [0845] 260 (딕케야 제아에(*Dickeya zeae*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER187758](#))
- [0846] 261 (펙토박테리움 카로토보룸(*Pectobacterium carotovorum*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER001045](#))
- [0847] 262 (펙토박테리움 와사비아에(*Pectobacterium wasabiae*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER187830](#))
- [0848] 263 (딕케야 다단티) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER182707](#))
- [0849] 264 M04.023 (시트로박터 로덴툼(*Citrobacter rodentium*)) zpx 웹티다제 ([MER196184](#))
- [0850] 265 M04.023 (엔테로박터 칸세로게누스(*Enterobacter cancerogenus*)) zpx 웹티다제 ([MER187772](#))
- [0851] 266 M04.023 (살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*)) zpx 웹티다제 ([MER108712](#))
- [0852] 267 M04.023 (엔테로박터 사카자키(*Enterobacter sakazakii*)) zpx 웹티다제 (zpx 단백질) ([MER091601](#))
- [0853] 268 M04.023 (에르위니아 아밀로보라(*Erwinia amylovora*)) zpx 웹티다제 (prt1 단백질) ([MER202074](#))
- [0854] 269 M04.025 (에르위니아 빌링기아에(*Erwinia billingiae*)) 프로테아리신(protealysin) (mpr 단백질) ([MER220902](#))
- [0855] 270 M04.025 (판토에아 종 At-9b) 프로테아리신 ([MER232022](#))
- [0856] 271 M04.025 (판토에아 아나나티스(*Pantoea ananatis*)) 프로테아리신 ([MER202817](#))
- [0857] 272 M04.025 (라벨라 종 Y9602) 프로테아리신 ([MER237139](#))
- [0858] 273 M04.025 (세라티아 그리메시(*Serratia grimesii*)) 프로테아리신 ([MER115298](#))
- [0859] 274 M04.025 (세라티아 종 A2) 프로테아리신 ([MER119664](#))
- [0860] 275 M04.025 (세라티아 프로테아마쿨란스(*Serratia proteamaculans*)) 프로테아리신 ([MER059439](#))
- [0861] 276 M04.025 (세라티아 종 AS9) 프로테아리신 ([MER249825](#))
- [0862] 277 M04.025 (세라티아 종 AS12) 프로테아리신 ([MER249807](#))
- [0863] 278 (제오더마토필루스 오브스쿠루스(*Geodermatophilus obscurus*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER132589](#))
- [0864] 279 (젬마타 오브스쿠리글로부스(*Gemmata obscuriglobus*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER187768](#))
- [0865] 280 (노카르디오이데스 종 JS614) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER049523](#))
- [0866] 281 M04.024 (제노라브두스 보비에니(*Xenorhabdus bovienii*)) PrtS 웹티다제 (포토라브두스 루미네센스 (*Photorhabdus luminescens*)) ([MER200616](#))
- [0867] 282 M04.024 (제노라브두스 네마토필라(*Xenorhabdus nematophila*)) PrtS 웹티다제 ([MER219816](#))
- [0868] 283 M04.024 (제노라브두스 네마토필라) PrtS 웹티다제 ([MER219815](#))
- [0869] 284 M04.024 (포토라브두스 아심비오티카(*Photorhabdus asymbiotica*)) PrtS 웹티다제 ([MER187759](#))
- [0870] 285 M04.024 (포토라브두스 루미네센스) PrtS 웹티다제 ([MER033481](#))
- [0871] 286 M04.024 (포토라브두스 종 Az29) PrtS 웹티다제 ([MER115297](#))

- [0872] 287 (아스퍼질러스 테레우스(*Aspergillus terreus*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER091644](#))
- [0873] 288 (네오사르토리아 피쉐리(*Neosartorya fischeri*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER091615](#))
- [0874] 289 (페레노포라 트리티시-레펜티스(*Pyrenophora tritici-repentis*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER138903](#))
- [0875] 290 (사카로폴리스포라 에리트라에아(*Saccharopolyspora erythraea*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER088688](#))
- [0876] 291 (넥트리아 하에마토코카(*Nectria haematococca*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER243771](#))
- [0877] 292 (지베렐라 제아에(*Gibberella zae*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER064838](#))
- [0878] 293 (메타리지움 아니소플리아에(*Metarhizium anisopliae*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER243770](#))
- [0879] 294 (메타리지움 아크리둠(*Metarhizium acridum*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER243769](#))
- [0880] 295 (와들리아 콘드로필라(*Waddlia chondrophila*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER211844](#))
- [0881] 296 (슈도모나스 사바스타노이(*Pseudomonas savastanoi*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER232822](#))
- [0882] 297 (슈도모나스 시린가에(*Pseudomonas syringae*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER052672](#))
- [0883] 298 (슈도모나스 코로나파시엔스(*Pseudomonas coronafaciens*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER187813](#))
- [0884] 299 (시아노테세 종 ATCC 51142) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER103362](#))
- [0885] 300 (바실러스 써린지엔시스) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER187783](#))
- [0886] 301 (바실러스 세레우스) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER178978](#))
- [0887] 302 (바실러스 세레우스) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER187811](#))
- [0888] 303 (바실러스 써린지엔시스) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER187778](#))
- [0889] 304 (바실러스 세레우스) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER187807](#))
- [0890] 305 (메타노사르시나 아세티보란스) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER017698](#))
- [0891] 306 (바실러스 써린지엔시스) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER187784](#))
- [0892] 307 (바실러스 써린지엔시스) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER187788](#))
- [0893] 308 (셀룰로파가 알기콜라(*Cellulophaga algicola*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER235562](#))
- [0894] 309 (아스퍼질러스 니게르(*Aspergillus niger*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER091631](#))
- [0895] 310 (프로비덴시아 루스티기아니(*Providencia rustigianii*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER187773](#))
- [0896] 311 (프로비덴시아 알칼리파시엔스(*Providencia alcalifaciens*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER187774](#))
- [0897] 312 (프로비덴시아 레트게리(*Providencia rettgeri*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER187775](#))
- [0898] 313 (프로비덴시아 수투아르티(*Providencia stuartii*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER122839](#))
- [0899] 314 (마이코박테리움 압세수스(*Mycobacterium abscessus*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER117364](#))
- [0900] 315 (마이코박테리움 압세수스) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER117363](#))
- [0901] 316 (브라디리조비움 자포니쿰(*Bradyrhizobium japonicum*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER026988](#))
- [0902] 317 (아그로박테리움 비티스(*Agrobacterium vitis*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER162454](#))
- [0903] 318 (무실라기니박터 팔루디스(*Mucilaginibacter paludis*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER229316](#))
- [0904] **웨티다제_M4_C**
- [0905] 319 (세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER001046](#))
- [0906] 320 (스트렙토마이세스 가나엔시스) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER187815](#))
- [0907] **웨티다제_M4~웨티다제_M4_C**

- [0908] 321 (소란지움 셀룰로숨(*Sorangium cellulosum*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER114292](#))
- [0909] 웨티다제_M4~웨티다제_M4_C
- [0910] 322 (스트렙토마이세스 필라멘토수스) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER091679](#))
- [0911] *PepSY~웨티다제_M4~웨티다제_M4_C*
- [0912] 323 (스트렙토마이세스 아베르미틸리스) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER028519](#))
- [0913] 324 (스트렙토스포란지움 로세움(*Streptosporangium roseum*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER187812](#))
- [0914] 웨티다제_M4~웨티다제_M4_C
- [0915] 325 M04.007 (엔테로코쿠스 파에시움(*Enterococcus faecium*)) 코코리신(coccolysin) ([MER187749](#))
- [0916] 326 M04.007 (엔테로코쿠스 파에칼리스(*Enterococcus faecalis*)) 코코리신 ([MER002810](#))
- [0917] 327 (레니박테리움 살모니나룸(*Renibacterium salmoninarum*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER002083](#))
- [0918] 328 (크리밸라 플라비다) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER079366](#))
- [0919] 329 (헤르페토시폰 아우란티아쿠스) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER085851](#))
- [0920] 웨티다제_M4~웨티다제_M4_C
- [0921] 330 M04.016 (아에로모나스 잔다에이(*Aeromonas jandaei*)) PA 웨티다제 (아에로모나스-유형) ([MER079815](#))
- [0922] 331 M04.016 (아에로모나스 유크레노필라(*Aeromonas eucrenophila*)) PA 웨티다제 (아에로모나스-유형) ([MER079803](#))
- [0923] *PepSY~웨티다제_M4~웨티다제_M4_C~PPC*
- [0924] 332 M04.016 (아에로모나스 편크타타(*Aeromonas punctata*)) PA 웨티다제 (아에로모나스-유형) ([MER029943](#))
- [0925] 웨티다제_M4~웨티다제_M4_C
- [0926] 333 M04.016 (아에로모나스 엔켈레이아(*Aeromonas enchelyea*)) PA 웨티다제 ([MER079817](#))
- [0927] 334 M04.016 (아에로모나스 베스티아룸(*Aeromonas bestiarum*)) PA 웨티다제 ([MER079816](#))
- [0928] 335 M04.016 (아에로모나스 메디아(*Aeromonas media*)) PA 웨티다제 ([MER079802](#))
- [0929] 336 M04.016 (아에로모나스 살모니시다(*Aeromonas salmonicida*)) PA 웨티다제 ([MER079819](#))
- [0930] *PepSY~웨티다제_M4~웨티다제_M4_C~PPC*
- [0931] 337 M04.016 (아에로모나스 편크타타) PA 웨티다제 ([MER030073](#))
- [0932] 웨티다제_M4~웨티다제_M4_C
- [0933] 338 M04.016 (아에로모나스 엔켈레이아) PA 웨티다제 ([MER079804](#))
- [0934] 339 M04.016 (아에로모나스 포포피(*Aeromonas popoffii*)) PA 웨티다제 ([MER079805](#))
- [0935] 340 M04.016 (아에로모나스 하이드로필라(*Aeromonas hydrophila*)) PA 웨티다제 ([MER011853](#))
- [0936] 341 M04.016 (아에로모나스 종 CDC 2478-85) PA 웨티다제 ([MER079818](#))
- [0937] 342 M04.016 (아에로모나스 슈베르티(*Aeromonas schuberti*)) PA 웨티다제 (아에로모나스-유형) ([MER079806](#))
- [0938] *PepSY~웨티다제_M4~웨티다제_M4_C~PPC*
- [0939] 343 (아에로모나스 베로니(*Aeromonas veronii*)) M4 미활당 웨티다제 ([MER055154](#))
- [0940] 웨티다제_M4~웨티다제_M4_C
- [0941] 344 (아에로모나스 소브리아(*Aeromonas sobria*)) M4 미활당 웨티다제 ([MER079820](#))
- [0942] *FTP-PepSY~웨티다제_M4~웨티다제_M4_C~PPC~PPC*

- [0943] 345 (레이네케아 종 MED297) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER083727](#))
- [0944] 346 (쉬와넬라 데니트리피칸스(*Shewanella denitrificans*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER050231](#))
- [0945] **PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C~PPC~PKD**
- [0946] 347 (쉬와넬라 발티카(*Shewanella baltica*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER048895](#))
- [0947] 348 (쉬와넬라 아마조넨시스(*Shewanella amazonensis*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER048811](#))
- [0948] 349 (쉬와넬라 우디이(*Shewanella woodyi*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER087265](#))
- [0949] **PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C**
- [0950] 350 (크로모박테리움 비올라세움(*Chromobacterium violaceum*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER027350](#))
- [0951] **PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C~PPC~PPC**
- [0952] 351 (슈도알테로모나스 종 SB-B1) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER140592](#))
- [0953] 352 (슈도알테로모나스 종 SM9913) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER091617](#))
- [0954] 353 (슈도알테로모나스 종 A28) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER019098](#))
- [0955] 354 (남극 박테리움 균주 (*Antarctic bacterium str.*) 643) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER012255](#))
- [0956] 355 (슈도알테로모나스 종 SM495) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER187748](#))
- [0957] 356 (슈도알테로모나스 피시시다(*Pseudoalteromonas piscicida*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER019099](#))
- [0958] 357 (슈도알테로모나스 루테니카(*Pseudoalteromonas ruthenica*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER187751](#))
- [0959] 358 (슈도알테로모나스 투니카타) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER108855](#))
- [0960] 359 (모리텔라 비스코사(*Moritella viscosa*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER139442](#))
- [0961] 360 (할리안지움 오크라세움(*Haliangium ochraceum*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER114761](#))
- [0962] 361 (할리안지움 오크라세움) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER124450](#))
- [0963] 362 (칸지엘라 코리엔시스(*Kangiella koreensis*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER065613](#))
- [0964] **PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C~PPC**
- [0965] 363 M04.003 (마리노모나스 종 MED121) 비브리오리신(vibriolysin) ([MER139826](#))
- [0966] 364 (비브리오 스플렌디두스(*Vibrio splendidus*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER122486](#))
- [0967] **PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C~PPC~PKD**
- [0968] 365 (비브리오 날레스 박테리움 SWAT-3) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER139254](#))
- [0969] **PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C~PKD**
- [0970] 366 (비브리오 투비아쉬(*Vibrio tubiashii*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER187750](#))
- [0971] 367 (비브리오 하르베이(*Vibrio harveyi*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER091688](#))
- [0972] 368 (비브리오 캠프밸리(*Vibrio campbellii*)) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER139568](#))
- [0973] **PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C**
- [0974] 369 (쉬와넬라 종 MR-7) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER072768](#))
- [0975] 370 (쉬와넬라 종 MR-4) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER073030](#))
- [0976] 371 (쉬와넬라 종 ANA-3) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER073381](#))
- [0977] 372 (쉬와넬라 아마조넨시스) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER049928](#))
- [0978] 373 (쉬와넬라 우디이) 패밀리 M4 미활당 웨티다제 ([MER087209](#))

- [0979] 374 (비브리오 파라하에몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER027936](#))
- [0980] **PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C~PPC**
- [0981] 375 (비브리오 종 Ex25) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER139749](#))
- [0982] 376 (비브리오 하르베이) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER109271](#))
- [0983] 377 (한헬라 제주엔시스) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER080002](#))
- [0984] 378 M04.003 (모리텔라 종 PE36) 비브리오리신 ([MER113768](#))
- [0985] **PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C~PPC~PPC~P_프로단백질**
- [0986] 379 (미배양 박테리움 pTW3) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER164961](#))
- [0987] 380 (미배양 박테리움 pTW2) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER164951](#))
- [0988] **PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C**
- [0989] 381 M04.005 (슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)) 슈도리신(pseudolysin) ([MER001024](#))
- [0990] **PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C~PPC**
- [0991] 382 M04.003 (비브리오 투비아쉬) 비브리오리신 ([MER139044](#))
- [0992] 383 M04.003 (비브리오 프로테올리티쿠스(*Vibrio proteolyticus*)) 비브리오리신 ([MER001043](#))
- [0993] 384 M04.003 (리스토넬라 암구일라룸(*Listonella anguillarum*)) 비브리오리신 ([MER120583](#))
- [0994] 385 M04.003 (비브리오 암구일라룸(*Vibrio anguillarum*)) 비브리오리신 ([MER001044](#))
- [0995] 386 M04.003 (리스토넬라 암구일라룸) 비브리오리신 ([MER120671](#))
- [0996] 387 M04.003 (비브리오 아에스투아리아누스(*Vibrio aestuarianus*)) 비브리오리신 ([MER113809](#))
- [0997] 388 M04.003 (비브리오 불니피쿠스) 비브리오리신 ([MER003353](#))
- [0998] 389 M04.010 (비브리오 스플렌디두스) 비멜리신(vimelysin) ([MER091636](#))
- [0999] 390 M04.010 (비브리오 종 MED222) 비멜리신 ([MER113711](#))
- [1000] 391 M04.010 (비브리오 종 T-1800) 비멜리신 ([MER029796](#))
- [1001] 392 M04.010 (비브리오날레스 박테리움 SWAT-3) 비멜리신 ([MER109237](#))
- [1002] 393 M04.003 (비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*)) 비브리오리신 ([MER001041](#))
- [1003] 394 M04.003 (비브리오 미미쿠스) 비브리오리신 ([MER122299](#))
- [1004] 395 M04.003 (비브리오 플루비알리스(*Vibrio fluvialis*)) 비브리오리신 ([MER019097](#))
- [1005] 396 M04.003 (살리니비브리오 종 AF-2004) 비브리오리신 ([MER091639](#))
- [1006] 397 M04.010 (포토박테리움 종 SKA34) 비멜리신 ([MER110034](#))
- [1007] 398 M04.010 (비브리오 암구스툼(*Vibrio angustum*)) 비멜리신 ([MER109056](#))
- [1008] 399 M04.010 (포토박테리움 암구스툼(*Photobacterium angustum*)) 비멜리신 ([MER187763](#))
- [1009] 400 M04.010 (비브리오 암구스툼) 비멜리신 ([MER109302](#))
- [1010] **펩티다제_M4~펩티다제_M4_C**
- [1011] 401 (모리텔라 종 PE36) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER109180](#))
- [1012] **펩티다제_M4~펩티다제_M4_C**
- [1013] 402 (알테로모나달레스 박테리움 TW-7) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER091610](#))
- [1014] 403 (쇠와넬라 비올라세아) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER203253](#))

- [1015] 404 (비브리오 캄프밸리) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER168125](#))
- [1016] *PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C*
- [1017] 405 (레지오넬라 롱베아카에(*Legionella longbeachae*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER198565](#))
- [1018] 406 M04.020 (비브리오 종 AND4) pap6 웹티다제 ([MER187764](#))
- [1019] *PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C*
- [1020] 407 M04.020 (비브리오 캄프밸리) pap6 웹티다제 ([MER118605](#))
- [1021] 408 M04.020 (비브리오 하르베이) pap6 웹티다제 ([MER020240](#))
- [1022] *PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C*
- [1023] 409 (비브리오 스플렌디두스) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER139945](#))
- [1024] *펩티다제_M4~펩티다제_M4_C*
- [1025] 410 M04.006 (레지오넬라 뉴모필라(*Legionella pneumophila*)) Msp 웹티다제 (레지오넬라-유형) ([MER001039](#))
- [1026] 411 M04.006 (레지오넬라 드란코르티(*Legionella drancourtii*)) Msp 웹티다제 (레지오넬라-유형) ([MER187828](#))
- [1027] *PepSY~펩티다제_M4~펩티다제_M4_C*
- [1028] 412 M04.006 (레지오넬라 롱베아카에) Msp 웹티다제 (레지오넬라-유형) ([MER002394](#))
- [1029] 413 (레지오넬라 뉴모필라) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER040780](#))
- [1030] 414 (레지오넬라 드란코르티) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER187829](#))
- [1031] 415 (레지오넬라 롱베아카에) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER198471](#))
- [1032] 416 (레지오넬라 뉴모필라) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER040782](#))
- [1033] 417 (레지오넬라 뉴모필라) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER040781](#))
- [1034] *펩티다제_M4~펩티다제_M4_C~PKD~PKD~PKD*
- [1035] 418 M04.019 (슈도알테로모나스 퍼시시다) Mpr III ([MER024591](#))
- [1036] 419 (테레디니박터 투르네라에(*Teredinibacter turnerae*)) M4 미활당 웹티다제 ([MER187760](#))
- [1037] *펩티다제_M4~펩티다제_M4_C~PKD~PKD~PKD~PKD*
- [1038] 420 (레이네케아 종 MED297) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER083722](#))
- [1039] 421 (레이네케아 블란덴시스(*Reinekea blandensis*)) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER187762](#))
- [1040] *펩티다제_M4~펩티다제_M4_C*
- [1041] 422 (레이네케아 종 MED297) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER117392](#))
- [1042] 423 (알테로모나스(*Alteromonas*) 종 SN2) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER247991](#))
- [1043] *PepSY~펩티다제_M4_C*
- [1044] 424 (하이드로제니비르가 종 128-5-R1-1) 패밀리 M4 미활당 웹티다제 ([MER142070](#))
- [1045] B. 게놈 퀘스트(Genome Quest) 검색 알고리즘을 사용한 관련 분자의 동정
- [1046] 씨몰리신 (서열 번호 3)의 서열을 쿼리로서 사용하여, 부모 및 공공 도메인 데이터베이스에 대비하여 게놈 퀘스트 (www.genomequest.com)에서 진행된 단백질 BLAST 분석 (문헌[Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.(1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402])은 하기에 나타낸 결과를 산출하였다 (표 5.2). BLAST는 NCBI BLAST2 알고리즘의 게놈 퀘스트 구현이며, 생물학적 유사성의 관점에서 가장 연관된 서열을 찾아낸다. 서열 검색은 단백질 검색을 위한 하기 디폴트 BLAST 파라미터를 갖는다: 단어 크기: 3, E - 값 컷오프: 10, 스코어링 매트릭스: BLOSUM62, 캡 오프닝: 11, 캡 확장: 2

[1047] [표 5.2]

BLAST 분석에 의해 동정되는 썬볼리신 단백질(서열 번호 3)의 상동체. 사용된 용어: %ID = 피센트 서열 동일성, 식별자(Identifier) = 특허 번호-서열 번호 또는 공공 도메인 수탁 번호.

% ID	식별자	기원 생물	단백질명	참고
100	US20090263882-0183	바실러스 스테아로씨모필루스		
100	8TLN	바실러스 썬모프로테올리티쿠스	썬볼리신	Holland DR, Tronrud DE, Pley HW, Flaherty KM, Stark W, Janssonius JN, McKay DB, Matthews BW Biochemistry 31, 11310-11316 (1992)
100	AAA22625	제오바실러스 스테아로씨모필루스	증성 프로테아제 (nprS) 천구체	Nishiya,Y. and Imanaka,T. J. Bacteriol. 172 (9), 4861-4869 (1990)
99.68	US20090263882-0182	바실러스 썬모프로테올리티쿠스		
99.37	JP1994014788-0002	미확인		
99.37	CAA54291	바실러스 썬모프로테올리티쿠스	썬볼리신	O'Donohue,M.J., Biochem. J. 300 (PT 2), 599-603 (1994)
99.05	1LNA	바실러스 썬모프로테올리티쿠스	Chain E.	Titani,K., Nature New Biol. 238 (80), 35-37 (1972)
87.66	AAB18652	바실러스 칼돌리티쿠스	증성 프로테아제	Saul,D.J., Biochim. Biophys. Acta 1308 (1), 74-80 (1996)
87.66	WO2004011619-0003	특정되지 않음		
87.34	US20090263882-0184	바실러스 종		
87.34	AAA22623	바실러스 칼돌리티쿠스	증성 프로테아제	van den Burg,B., J. Bacteriol. 173 (13), 4107-4115 (1991)
86.39	EP0867512-0001	미확인		
86.39	AAA22621	제오바실러스 스테아로씨모필루스	열안정성 증성 프로테아제 (nprT)	Takagi,M., J. Bacteriol. 163 (3), 824-831 (1985)
79.43	BAD77123	제오바실러스 카우스토필루스 HTA426	가설 단백질	Takami,H., Nucleic Acids Res. 32 (21), 6292-6303 (2004)
73.42	1NPC	바실러스 세레우스, 균주 Dsm 3101	증성 프로테아제 (E.C.3.4.24.27)	Sidler,W., Biol. Chem. Hoppe-Seyler 367 (7), 643-657 (1986)
73.42	US20090263882-0195	바실러스 세레우스		
73.42	AAB62279	바실러스 씨런지엔시스 세로바르 쿠르스타크(<i>Bacillus thuringiensis serovar kurstaki</i>)	증성 프로테아제 A	Donovan,W.P., Appl. Environ. Microbiol. 63 (6), 2311-2317 (1997)
73.42	US5759538-0004	바실러스 씨런지엔시스		
73.1	AAK69076	바실러스 씨런지엔시스	증성 프로테아제	Choi,S.-K., Submitted (13-JUN-2000) Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon, Korea
73.1	US20090263882-0178	바실러스 씨런지엔시스		
72.78	AAU19730	바실러스 세레우스 E33L	바실로리신 (썬볼리신-유사 메탈로프로테아제, 펩티다제 M4)	Brettin,T.S., Submitted (14-JUL-2004) Joint Genome Institute, Department of Energy, CA 94598, USA
72.47	BAA06144	락토바실러스 종	하이드롤라제	Maeda,T., J. Ferment. Bioeng. (1994)
72.47	JP1995184649-0001	락토바실러스 종		
68.99	ACB62386	액시구오박테리움 시비리쿰 255-15	썬볼리신	Rodrigues Extremophiles 10 (4), 285-294 (2006)
67.72	ACQ69059	액시구오박테리움 종 AT1b	펩티다제 M4	Vishnivetskaya,T.A.,

[1048]

			씨볼리신	J. Bacteriol. 193 (11), 2880-2881 (2011)
67.41	US7642079-0142	미지		
66.14	CAA43589	브레비바실러스 브레비스 파에니바실러스 무실라기노수스(<i>Paenibacillus mucilaginosus</i>) KNP414	미생물 메탈로프로테이나제	Avakov,A.S Dokl. Biochem. 24, 1363-1372 (1990)
65.82	AEI46285		Npr	Wang,J., Submitted (08-JUN-2011) Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou, Zhejiang 310018, China
62.34	BAH42306	브레비바실러스 브레비스 NBRC 100599	바실로리신 전구체	Hosoyama,A., Submitted (31-MAR-2005) Contact: Director- NITE Genome Analysis Center (NGAC), Tokyo 151-0066, Japan
57.91	AEG80144	바실러스 씨린지 엔시스	메탈로프로테아제	Chudasama,C.J., Submitted (18-APR-2011) V P Science College, Sardar Patel University, Gujarat 388120, India
57.59	BAD13318	바실러스 비에트나멘시스	프로테아제	Kim,M Biosci. Biotechnol. Biochem. 68 (7), 1533-1540 (2004)
56.65	ADM71641	파에니바실러스 폴리믹사 E681	바실로리신 전구체 (중성 프로테아제)	Kim,J.F., J. Bacteriol. 192 (22), 6103-6104 (2010)
56.33	ADR72651	바실러스 종 NprB_유전자 MB	중성 프로테아제 B	Mustapha,S., Submitted (14-JUL-2010) University Malaysia Sabah, Biotechnology Research Institute, Kota Kinabalu, Sabah 88999, Malaysia
56.01	ADO58270	파에니바실러스 폴리믹사 SC2	바실로리신	Ma,M., J. Bacteriol. 193 (1), 311-312 (2011)
56.01	AAP35685	씨모악티노마이세스 종 27a	중성 프로테아제 전구체	Zabolotskaya,M.V., Protein J. 23 (7), 483-492 (2004)
55.7	US20090263882-0187	바실러스 폴리믹사		열안정성 중성 메탈로프로테아제
55.7	BAA00734	파에니바실러스 폴리믹사	세포외 중성 프로테아제	Takekawa,S., J. Bacteriol. 173 (21), 6820-6825 (1991)
55.06	ABK00710	바실러스 세레우스	추정 메탈로펩티다제	Rasko,D.A., J. Bacteriol. 189 (1), 52-64 (2007)
54.75	AAU15507	바실러스 세레우스 E33L	중성 프로테아제 B	Brettin,T.S., Submitted (14-JUL-2004) Joint Genome Institute, Department of Energy, CA 94598, USA
54.43	ABY46015	바실러스 바이헨슈테파넨시스 KBAB4	펩티다제 M4 씨볼리신	Lapidus,A. Chem. Biol. Interact. 171 (2), 236-249 (2008)
54.43	US20090263882-0180	바실러스 서브틸리스		열안정성 중성 메탈로프로테아제
54.11	ABS21909	바실러스 사이토톡시쿠스(<i>Bacillus cytotoxicus</i>) NVH 391-98	펩티다제 M4 씨볼리신	Lapidus,A. Chem. Biol. Interact. 171 (2), 236-249 (2008)
53.8	ADM71642	[파에니바실러스 폴리믹사 E681]	바실로리신 전구체 (중성 프로테아제)	Kim,J.F., J. Bacteriol. 192 (22), 6103-6104 (2010)
53.48	ACO28045	바실러스 세레우스 03BB102]	중성 프로테아제	Dodson,R.J., Submitted (03-FEB-2009) Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, USA
52.85	ACQ49186	바실러스 안트라시스 균주 A0248	중성 프로테아제 B	Dodson,R.J., Submitted (09-APR-2009) Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, USA
49.68	ABU53636	바실러스 서브틸리스	중성 프로테아제 전구체	Zhao,C Submitted (11-JUL-2007) College of Biotechnology, Tianjin Univ. of Science and Technology, 13 Street, Tianjing, Tianjin 300457, China
49.05	WO2009058661-0019	합성 작제물		시트레이트-안정성 중성 메탈로프로테아제의 사용 및 생성
48.73	ABS73818	바실러스 아밀로리퀴파시 엔스 FZB42	NprE	Chen,X.H Nat. Biotechnol. 25 (9), 1007-1014 (2007)

48.42	AAW59490	브레비바실러스 라테로스포루스	세포의 중성 프로테아제 전구체 ChW-반복에 응답된, 세포의 중성 메탈로프로테아제, NPRE	Tian,B.Y., Submitted (28-DEC-2004) Key Laboratory of Conservation and Utilization for Bioresources, Yunnan Univ, No. 2 North Road of Cuihu, Kunming, Yunnan 650091, China
48.1	ADZ21343	클로스트리듐 아세토부틸리쿰 EA 2018]		
47.78	BAJ41480	바실러스 서브틸리스	중성 프로테아제	Takenaka,S., Biosci. Biotechnol. Biochem. 75 (1), 148-151 (2011)
47.47	AEJ66824	스타필로코쿠스 에피데미스(<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	미국 특허 제 7968297 호로부터 의 서열 359	Meinke,A., Patent: US 7968297-B2 359 28-JUN-2011;
47.15	BAH18382	마크로코쿠스 카세올리티쿰 JCSC5402	아연 MMP 아우레올리신 상동체	Baba,T J., Bacteriol. 191 (4), 1180-1190 (2009)
46.84	AAA22670	바실러스 아밀로리퀴파시엔스	중성 프로테아제	Shimada,H., J. Biotechnol. 2, 75-85 (1985)
46.52	ADX06849	바실러스 서브틸리스	NprE	Liu,C., Wang,Z. and Yang,W. Submitted (29-DEC-2010) Anhui Agricultural University, College of Life Science, Changjiang West Road, Hefei, Anhui 230036, China
46.2	ADP31979	바실러스 아트로파에우스(<i>Bacillus atropheus</i>) 1942	세포의 중성 메탈로프로테아제	Gibbons,H.S Submitted (13-SEP-2010) Genomics Integrated Product Team, US Army Edgewood Chemical Biological Center, 5183 Blackhawk Rd, Aberdeen Proving Ground, MD 21010-5424, USA
45.57	ABN71638	스타필로코쿠스 아우레우스	아우레올리신 아우레울리신, 메탈로프로테아제	Sabat,A.J., BMC Microbiol. 8, 129 (2008) PUBMED 664262
45.25	IBQB	스타필로코쿠스 아우레우스		Medrano,F.J., Submitted (12-AUG-1998)
44.94	ABN71626	스타필로코쿠스 아우레우스	아우레울리신	Sabat,A.J., BMC Microbiol. 8, 129 (2008)
44.62	ABN71636	스타필로코쿠스 아우레우스	아우레울리신	Sabat,A.J., BMC Microbiol. 8, 129 (2008)
44.2	WO2007044993-0013	바실러스 아밀로리퀴파시엔스		보관-안정성 중성 메탈로프로테아제의 사용 및 생성
44.2	AAB05346	바실러스 아밀로리퀴파시엔스	프레프로뉴트랄(prer oneutral) 프로테아제 (gtg 시작 코돈)	Vasantha,N., J. Bacteriol. 159 (3), 811- 819 (1984)
44.2	AEB24126	바실러스 아밀로리퀴파시엔스 TA208	세포의 중성 메탈로프로테아제	Zhang,G., J. Bacteriol. 193 (12), 3142- 3143 (2011)
44.2	CBI42672	바실러스 아밀로리퀴파시엔스 DSM 7	세포의 중성 메탈로프로테아제	Borriiss,R., Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61 (PT 8), 1786-1801 (2011)
44.2	US20090263882-0003 WO2007044993-0003	바실러스 아밀로리퀴파시엔스		열안정성 중성 메탈로프로테아제 / 보관-안정성 중성 메탈로프로테아제의 사용 및 생성
44.2	WO2007044993-0018	바실러스 아밀로리퀴파시엔스	(성숙 NprE 서열)	보관-안정성 중성 메탈로프로테아제의 사용 및 생성

[1050]

실시예 6

향상된 안정성을 갖는 써몰리신의 변이체를 동정하기 위한 온도 인자의 사용

결정학적 온도 인자는 거대분자의 개별 원자들의 상대적 움직임의 척도이다. 이러한 온도 인자는, 결정 x-선 회절 최대치의 개별 강도로서 주어지는 계산된 회절 패턴이 관측 패턴과 가장 잘 정합하도록, 모델을 정교화한 결과로서 나타난다. 온도 인자는, 식 $-\exp(-B \sin^2 \theta / \lambda)$ (여기서, B는 온도 인자임)를 사용하여, 더 큰 움직임을 갖는 원자들이 산란각 (세타)의 함수로서 전체 거대분자 응집체 회절의 감소 효과를 가질 것임을 반영하도록 감쇠 인자로서 정교화된다 (문헌 [Blundell, T. L. and Johnson L. N., Protein Crystallography, Academic Press, 1976, pp121]).

더 높은 전반적 이동성을 갖는 영역은 또한 풀딩된 거대분자가 덜 안정한 지점을 나타낼 수 있고 따라서 온도 또는 변성의 증가에 의해 분자가 스트레스를 받을 때 풀링(unfolding)이 시작되는 지점일 수 있는 가능성이 크다. 전반적 이동성이 더 높은 이러한 영역은 평균 온도 인자가 가장 높은 영역일 것으로 또한 예상된다.

바실러스 써모프로테올리티쿰 써몰리신 단백질의 결정학적 구조는 다수의 독립적인 실험실에 의해 결정되었다. 8TLN, 2TLX 및 3D01의 엔트리 동정을 갖는 단백질 데이터 뱅크로부터 단백질의 3가지 독립적인 모델이 선택되었다. 본 발명자들은 결정 구조 내의 영역들을 스크리닝하여, 주쇄에 대한 온도 인자가 가장 크고 특히 평균 주쇄 온도 인자가 평균으로부터 관측 분산의 적어도 1.5배를 초과하는, 전반적인 이동성의 영역을 찾았다. 표 6a 내지 표 6c는, 주어진 결정학적 모델에서 전반적인 분자에 대한 평균 주쇄 온도 인자에 대해 관측되는 분산과 비교하여, 평균 주쇄 온도 인자의 z-스코어가 1.5 초과인 잔기를 열거한다. 이러한 3가지 구조에서, 써몰리신의 모든 잔기에 대한 평균 주쇄 온도 인자를 초과하여 관측 분산의 1.5배보다 큰 온도 인자를 나타내는 동일한 영역들이 발견된다. 이러한 영역들은 켄센서스 유연성 영역을 나타내며 하기 잔기를 포함한다:

[1056]

1-2 (N-말단 잔기), 127-128, 180-181, 195-199, 211, 223-224, 298-300, 및 316 (C-말단 잔기).

[1057]

[표 6a]

PDB: 8TLN

WT AA	POS	전체 분자에 대한 평균 주체 B-인자 평균 값 (17.79) 및 분산 (5.43)	
		평균	z-스코어
G	196	49.31	5.81
I	1	42.17	4.49
K	182	38.18	3.76
S	198	37.91	3.71
K	316	37.53	3.64
T	2	36.91	3.52
I	197	35.04	3.18
Y	211	33.64	2.92
P	195	33.4	2.88
G	199	30.8	2.4
S	298	30.3	2.3
Q	128	29.22	2.11
T	299	29.11	2.09
T	224	28.82	2.03
G	127	28.5	1.97
G	223	27.98	1.88
T	293	27.57	1.8
D	124	8.3	1.75
G	252	27.28	1.75
G	109	27.16	1.73
Q	301	27.03	1.7
K	210	26.6	1.62
A	73	9.38	1.55
D	126	26.19	1.55

[1058]

[1059]

[표 6b]

PDB: 3DO1

WT AA	POS	전체 분자에 대한 평균 주체 B-인자 평균 값 (19.92) 및 분산 (3.72)	
		평균	z-스코어
S	298	33.38	3.62
T	299	32.9	3.49
G	297	31.99	3.24
S	300	31.01	2.98
Y	296	30.95	2.97
L	295	29.54	2.59
Q	301	29.34	2.53
N	181	29.14	2.48
S	198	29.13	2.48
D	294	29.05	2.46
K	182	29.02	2.45
G	196	28.81	2.39
I	197	28.75	2.37
T	293	28.17	2.22
G	199	27.73	2.1
E	302	26.75	1.84
A	292	26.39	1.74
Q	128	26.13	1.67
A	180	25.86	1.6
V	303	25.81	1.58
Y	211	25.77	1.57
K	316	25.75	1.57
P	195	25.69	1.55
G	248	25.62	1.53
H	74	14.33	1.51

[1060]

[1061]

[표 6c]

PDB: 2TLX

WT AA	POS	전체 분자에 대한 평균 주체 B-인자 평균 값 (15.07) 및 분산 (4.68)	
		평균	z-스코어
G	196	34.46	4.15
S	198	32.73	3.78
T	299	31.52	3.52
I	197	31.25	3.46
I	1	30.27	3.25
K	316	29.83	3.16
T	2	29.61	3.11
S	298	29.53	3.09
T	224	28.08	2.78
P	195	27.95	2.76
G	223	27.95	2.76
T	222	27.77	2.72
G	199	27.62	2.68
K	182	27.34	2.63
Y	211	26.34	2.41
N	181	26.29	2.4
G	127	25.6	2.25
G	297	25.48	2.23
Q	128	25.42	2.21
S	300	23.98	1.91
Q	225	22.79	1.65
G	212	22.72	1.64
G	3	22.45	1.58
Q	301	22.28	1.54
D	294	22.2	1.52

[1062]

[1063]

분자 내 아미노산의 가능한 한 많은 단일 치환을 행함으로써 썬몰리신 내의 모든 부위를 스크리닝하였다. 상이한 세탁 세제 제형에서 승온에서의 개선된 세탁 성능 또는 열 안정성 중 어느 하나를 부여하는 몇몇 변이체가 이들 컨센서스 유연성 영역 중 하나에 상응하는 부위에서 발생하는 것으로 나타났다. 썬 올인원 터보 젤 또는 AT 제형 pH 8 세제에서의 개선된 세탁 성능 또는 개선된 열 안정성을 부여하는 컨센서스 유연성 영역에서의 대표적인 치환이 표 6.2에 열거되어 있다. 작업 가설은 이들 유연성 영역이 단백질 풀립의 최초 부위라는 것이다. 이러한 가설에 기초하면, 상이한 컨센서스 유연성 영역들로부터의 변이체들의 조합이 더 큰 안정성을 제공할 것으로 예측될 수 있다. 표 2에 나타낸 것들로부터 선택된 몇몇 유연성 영역들의 동시 안정성은 상당히 안정한 분자를 야기할 것이다.

[1064]

[표 6.2]

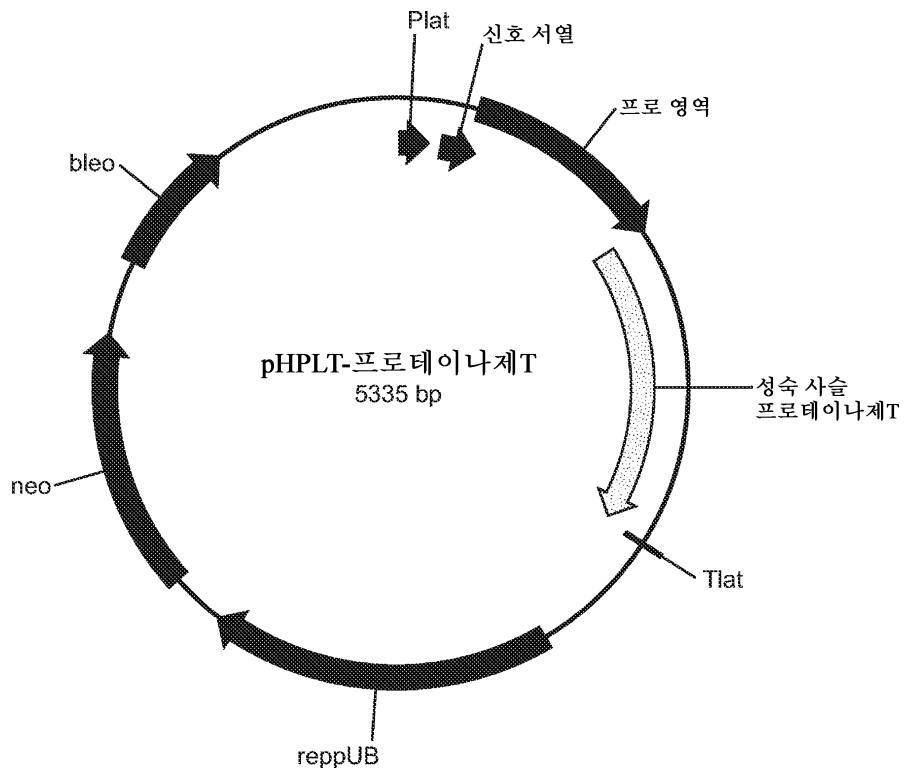
컨센서스 유연성 영역에서의 안정성 변이체

컨센서스 유연성 영역	위치	안정성 변이체 (WT AA 1 st)
1-2	1	I,V
	2	T,C,I,M,P,Q,V
127-128	127	G,C
	128	Q,C,E,F,I,L,V,Y
180-181	180	A,E,N
	181	N,A,G,Q,S
195-199	196	G,L,Y
	197	I,F
211	198	S,A,C,D,E,H,I,M,P,Q,T,V,Y
	211	Y,A,C,E,F,H,I,Q,S,T,V,W
223-224	224	T,D,H,Y
298-300	298	S,A,C,E,F,G,K,M,N,P,Q,R,T,W,Y
	299	T,A,C,D,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,W
316	316	K,A,D,E,H,M,N,P,Q,S,T,V,Y

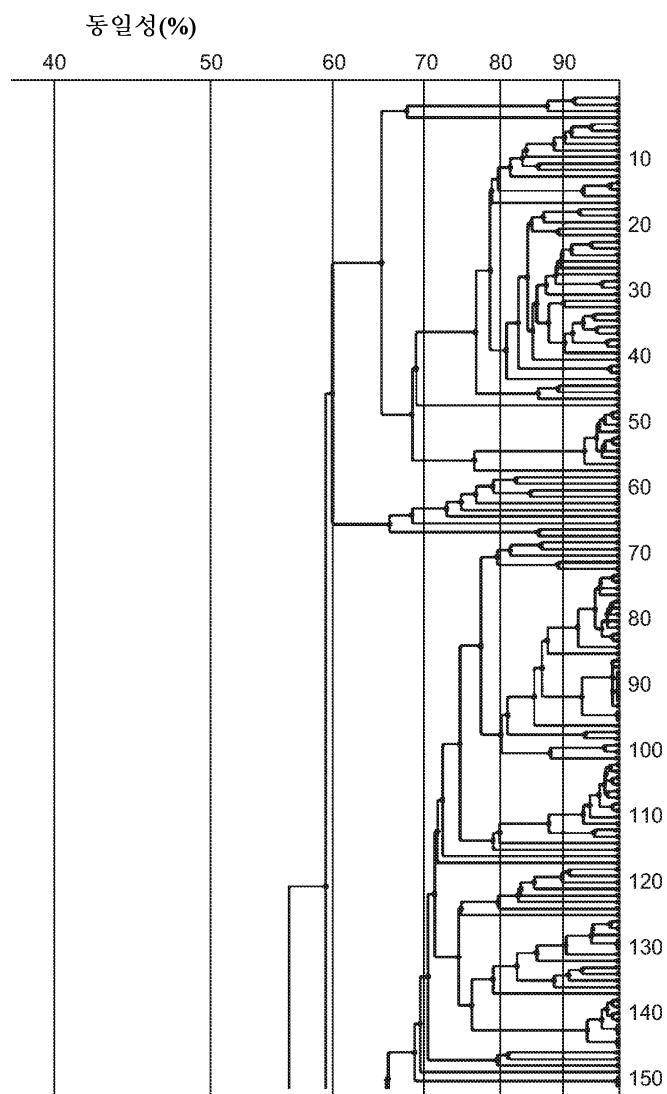
[1065]

도면

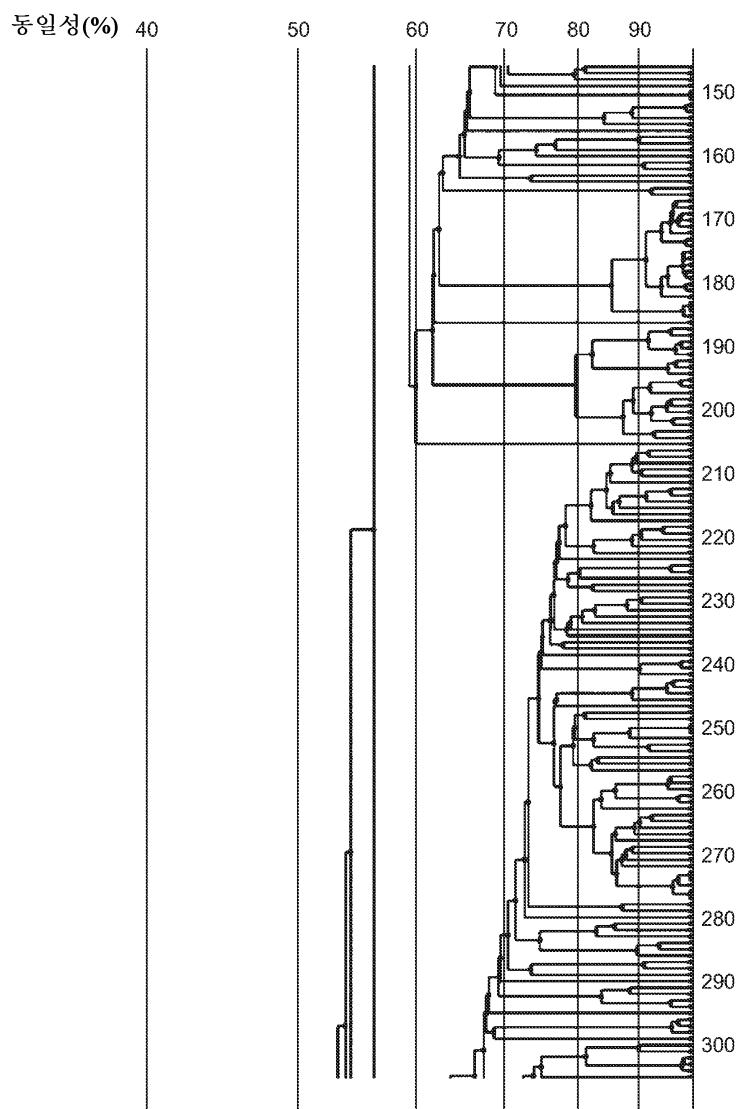
도면1



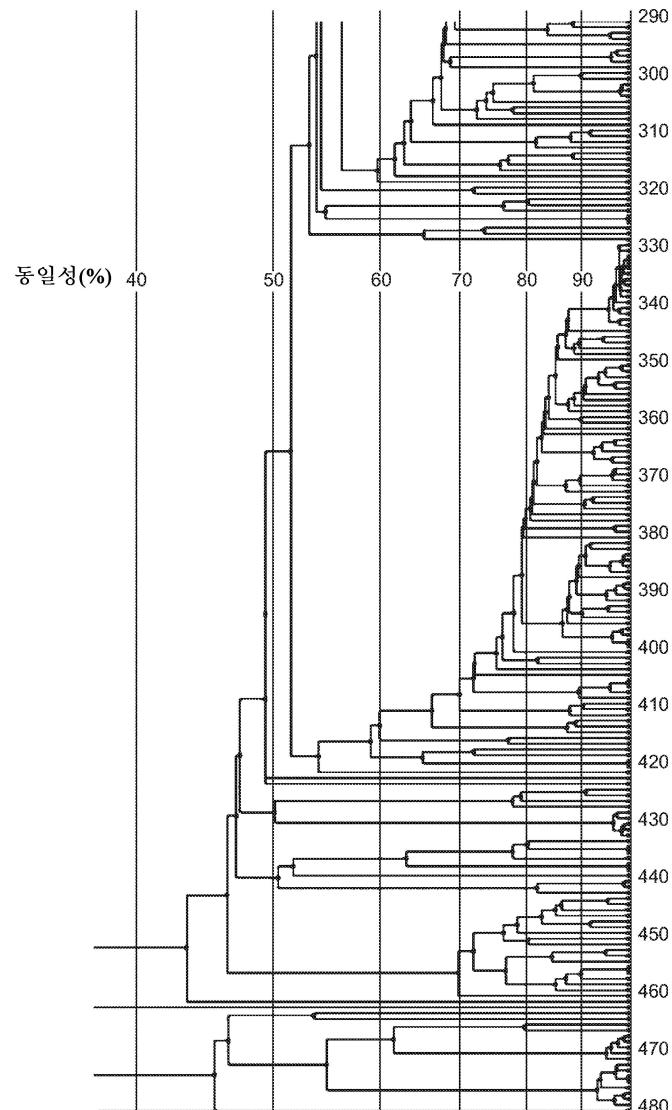
도면2a



도면2b



도면2c



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> DANISCO US INC.

ALEKSEYEV, Victor Yuryevich

BABE, Lilia Maria

ESTELL, David A.

GOEDEGEBUUR, Frits

MULDER, Harm

TORRES PAZMINO, Daniel Esteban

YAO, Jian

<120> COMPOSITIONS AND METHODS COMPRISING THERMOLYSIN PROTEASE VARIANTS

<130> 31611WO-2

<140> PCT/US13/68590

<141> 2013-11-05

<150> US 61/722,660

<151> 2012-11-05

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211>

> 1644

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence of Thermolysin gene from expression plasmid

pHPLT-ProteinaseT

<400> 1

atgaaaatga	aatgaaatt	agcatcgtt	ggtcttgcag	caggactagc	ggcccaagta	60
tttttacctt	acaatgcgct	ggcttcaacg	gaacacgtta	catggaacca	acaattcaa	120
accctcaat	tcatctccgg	tgatctgctg	aaagtgaatg	gcacatcccc	agaagaactc	180
gtctatcaat	atgttggaaa	aaacgaaaac	aagttaat	ttcatgaaaa	cgctaaggat	240
actctacaat	tgaaagaaaa	gaaaaatgat	aacctgggtt	ttacgtttat	gcacttccaa	300

caaacgtata	aagggattcc	tgtgttgga	gcagtagtaa	ctgcgcacgt	gaaagatggc	360
acgctgacgg	cgctatcagg	gacactgatt	ccgaatttgg	acacgaaagg	atccctaaaa	420
agcgggaaga	aatttgagtga	gaaacaagcg	cgtgacatttgc	ctgaaaaaga	tttagtggca	480
aatgtAACAA	aggaagtacc	ggaatatgaa	caggaaaag	acaccgagtt	tgttggttat	540
gtcaatgggg	acgaggcttc	tttagcgtac	gttgtcaatt	taaactttt	aactcctgaa	600
ccagggaaact	ggctgtatat	cattgatgcc	gtagacggaa	aaattttaaa	taaatttaac	660
caacttgacg	ccgcaaaacc	aggtgacgac	aagtgcataa	caggAACATC	aactgtcgga	720

gtgggaagag	gagtacttgg	tgatcaaaaa	aatattaata	caacctactc	tacgtactac	780
tatTTACAAG	ataatacgcg	tggaaatggg	atTTcacgt	atgatgcgaa	ataccgtacg	840
acattGCCGG	gaagctttag	ggcagatgca	gataaccaat	ttttgcgag	ctatgatgct	900
ccagCGGTTG	atgctcatta	ttacgttgg	gtgacatatg	actactataa	aatgttcat	960
aaccgtctca	gttacgacgg	aaataatgca	gctatttagat	catccgttca	ttatagccaa	1020

ggctataata acgcattttg gaacggttcg caaatgggt atggcgatgg tggatggtcaa 1080
 acattttattt cactttctgg tggatgtatgtat gtggtcgcac atgagttaac gcatgcggta 1140

accgattaca cagccggact catttatcaa aacgaatctg gtgcaattaa tgaggcaata 1200
 tctgatattt ttggAACttt agtcgaattt tacgctaaca aaaatccaga ttggaaattt 1260
 ggagaggatg tgtatacacc tggatTTca ggggattcgc tccgatcgat gtccgatccg 1320
 gcaaagtatg gtgatccaga tcactattca aagcgctata caggcacgca agataatggc 1380
 ggggttcata tcaatagccg aattatcaac aaagccgctt atttgattag ccaaggcggt 1440
 acgcattacg gtgtgagtgt tgcggaaatc ggacgcgata aattgggaa aattttctat 1500
 cgtgcattaa cgcaatattt aacaccaacg tccaaactta gccaacttcg tgctgccgt 1560

gttcaatcag ccactgactt gtacggttcg acaagccagg aagtgccttc tgtgaagcag 1620
 gcctttgatg cggtaggggt gaaa 1644

<210> 2

<211> 548

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of Thermolysin from expression plasmid

pHPLT-ProteinaseT
 <400> 2
 Met Lys Met Lys Met Lys Leu Ala Ser Phe Gly Leu Ala Ala Gly Leu
 1 5 10 15
 Ala Ala Gln Val Phe Leu Pro Tyr Asn Ala Leu Ala Ser Thr Glu His

20 25 30
 Val Thr Trp Asn Gln Gln Phe Gln Thr Pro Gln Phe Ile Ser Gly Asp
 35 40 45
 Leu Leu Lys Val Asn Gly Thr Ser Pro Glu Glu Leu Val Tyr Gln Tyr
 50 55 60
 Val Glu Lys Asn Glu Asn Lys Phe Lys Phe His Glu Asn Ala Lys Asp
 65 70 75 80
 Thr Leu Gln Leu Lys Glu Lys Asn Asp Asn Leu Gly Phe Thr Phe

85 90 95
 Met His Phe Gln Gln Thr Tyr Lys Gly Ile Pro Val Phe Gly Ala Val

100	105	110
Val Thr Ala His Val Lys Asp Gly Thr Leu Thr Ala Leu Ser Gly Thr		
115	120	125
Leu Ile Pro Asn Leu Asp Thr Lys Gly Ser Leu Lys Ser Gly Lys Lys		
130	135	140
Leu Ser Glu Lys Gln Ala Arg Asp Ile Ala Glu Lys Asp Leu Val Ala		
145	150	155
Asn Val Thr Lys Glu Val Pro Glu Tyr Glu Gln Gly Lys Asp Thr Glu		
165	170	175
Phe Val Val Tyr Val Asn Gly Asp Glu Ala Ser Leu Ala Tyr Val Val		
180	185	190
Asn Leu Asn Phe Leu Thr Pro Glu Pro Gly Asn Trp Leu Tyr Ile Ile		
195	200	205
Asp Ala Val Asp Gly Lys Ile Leu Asn Lys Phe Asn Gln Leu Asp Ala		
210	215	220
Ala Lys Pro Gly Asp Val Lys Ser Ile Thr Gly Thr Ser Thr Val Gly		
225	230	235
Val Gly Arg Gly Val Leu Gly Asp Gln Lys Asn Ile Asn Thr Thr Tyr		
245	250	255
Ser Thr Tyr Tyr Tyr Leu Gln Asp Asn Thr Arg Gly Asn Gly Ile Phe		
260	265	270
Thr Tyr Asp Ala Lys Tyr Arg Thr Thr Leu Pro Gly Ser Leu Trp Ala		
275	280	285
Asp Ala Asp Asn Gln Phe Phe Ala Ser Tyr Asp Ala Pro Ala Val Asp		
290	295	300
Ala His Tyr Tyr Ala Gly Val Thr Tyr Asp Tyr Tyr Lys Asn Val His		
305	310	315
Asn Arg Leu Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Ala Ala Ile Arg Ser Ser Val		
325	330	335
His Tyr Ser Gln Gly Tyr Asn Asn Ala Phe Trp Asn Gly Ser Gln Met		
340	345	350

Val Tyr Gly Asp Gly Asp Gly Gln Thr Phe Ile Pro Leu Ser Gly Gly
 355 360 365
 Ile Asp Val Val Ala His Glu Leu Thr His Ala Val Thr Asp Tyr Thr
 370 375 380
 Ala Gly Leu Ile Tyr Gln Asn Glu Ser Gly Ala Ile Asn Glu Ala Ile
 385 390 395 400
 Ser Asp Ile Phe Gly Thr Leu Val Glu Phe Tyr Ala Asn Lys Asn Pro

 405 410 415
 Asp Trp Glu Ile Gly Glu Asp Val Tyr Thr Pro Gly Ile Ser Gly Asp
 420 425 430
 Ser Leu Arg Ser Met Ser Asp Pro Ala Lys Tyr Gly Asp Pro Asp His
 435 440 445
 Tyr Ser Lys Arg Tyr Thr Gly Thr Gln Asp Asn Gly Gly Val His Ile
 450 455 460
 Asn Ser Gly Ile Ile Asn Lys Ala Ala Tyr Leu Ile Ser Gln Gly Gly

 465 470 475 480
 Thr His Tyr Gly Val Ser Val Val Gly Ile Gly Arg Asp Lys Leu Gly
 485 490 495
 Lys Ile Phe Tyr Arg Ala Leu Thr Gln Tyr Leu Thr Pro Thr Ser Asn
 500 505 510
 Phe Ser Gln Leu Arg Ala Ala Val Gln Ser Ala Thr Asp Leu Tyr
 515 520 525
 Gly Ser Thr Ser Gln Glu Val Ala Ser Val Lys Gln Ala Phe Asp Ala

 530 535 540
 Val Gly Val Lys
 545
 <210> 3
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Amino acid sequence of the Thermolysin mature protein produced
 from pHPLT-ProteinaseT plasmid

<400> 3

Ile Thr Gly Thr Ser Thr Val Gly Val Gly Arg Gly Val Leu Gly Asp

1 5 10 15

Gln Lys Asn Ile Asn Thr Thr Tyr Ser Thr Tyr Tyr Tyr Leu Gln Asp

20 25 30

Asn Thr Arg Gly Asn Gly Ile Phe Thr Tyr Asp Ala Lys Tyr Arg Thr

35 40 45

Thr Leu Pro Gly Ser Leu Trp Ala Asp Ala Asp Asn Gln Phe Phe Ala

50 55 60

Ser Tyr Asp Ala Pro Ala Val Asp Ala His Tyr Tyr Ala Gly Val Thr

65 70 75 80

Tyr Asp Tyr Tyr Lys Asn Val His Asn Arg Leu Ser Tyr Asp Gly Asn

85 90 95

Asn Ala Ala Ile Arg Ser Ser Val His Tyr Ser Gln Gly Tyr Asn Asn

100 105 110

Ala Phe Trp Asn Gly Ser Gln Met Val Tyr Gly Asp Gly Gln

115 120 125

Thr Phe Ile Pro Leu Ser Gly Gly Ile Asp Val Val Ala His Glu Leu

130 135 140

Thr His Ala Val Thr Asp Tyr Thr Ala Gly Leu Ile Tyr Gln Asn Glu

145 150 155 160

Ser Gly Ala Ile Asn Glu Ala Ile Ser Asp Ile Phe Gly Thr Leu Val

165 170 175

Glu Phe Tyr Ala Asn Lys Asn Pro Asp Trp Glu Ile Gly Glu Asp Val

180 185 190

Tyr Thr Pro Gly Ile Ser Gly Asp Ser Leu Arg Ser Met Ser Asp Pro

195 200 205

Ala Lys Tyr Gly Asp Pro Asp His Tyr Ser Lys Arg Tyr Thr Gly Thr

210 215 220

Gln Asp Asn Gly Gly Val His Ile Asn Ser Gly Ile Ile Asn Lys Ala

225 230 235 240

Ala Tyr Leu Ile Ser Gln Gly Gly Thr His Tyr Gly Val Ser Val Val

245 250 255

Gly Ile Gly Arg Asp Lys Leu Gly Lys Ile Phe Tyr Arg Ala Leu Thr

260 265 270

Gln Tyr Leu Thr Pro Thr Ser Asn Phe Ser Gln Leu Arg Ala Ala Ala

275 280 285

Val Gln Ser Ala Thr Asp Leu Tyr Gly Ser Thr Ser Gln Glu Val Ala

290 295 300

Ser Val Lys Gln Ala Phe Asp Ala Val Gly Val Lys

305 310 315

<210> 4

<211> 548

<212> PRT

<213> *Bacillus thermoproteolyticus*

<220><221> misc_feature

<223> Full-length amino acid sequence of the thermolysin from *Bacillus thermoproteolyticus*

<400> 4

Met Lys Met Lys Met Lys Leu Ala Ser Phe Gly Leu Ala Ala Gly Leu

1 5 10 15

Ala Ala Gln Val Phe Leu Pro Tyr Asn Ala Leu Ala Ser Thr Glu His

20 25 30

Val Thr Trp Asn Gln Gln Phe Gln Thr Pro Gln Phe Ile Ser Gly Asp

35 40 45

Leu Leu Lys Val Asn Gly Thr Ser Pro Glu Glu Leu Val Tyr Gln Tyr

50 55 60

Val Glu Lys Asn Glu Asn Lys Phe Lys Phe His Glu Asn Ala Lys Asp

65 70 75 80

Thr Leu Gln Leu Lys Glu Lys Asn Asp Asn Leu Gly Phe Thr Phe

85 90 95

Met Arg Phe Gln Gln Thr Tyr Lys Gly Ile Pro Val Phe Gly Ala Val

100 105 110

Val Thr Ser His Val Lys Asp Gly Thr Leu Thr Ala Leu Ser Gly Thr
 115 120 125
 Leu Ile Pro Asn Leu Asp Thr Lys Gly Ser Leu Lys Ser Gly Lys Lys
 130 135 140
 Leu Ser Glu Lys Gln Ala Arg Asp Ile Ala Glu Lys Asp Leu Val Ala
 145 150 155 160
 Asn Val Thr Lys Glu Val Pro Glu Tyr Glu Gln Gly Lys Asp Thr Glu
 165 170 175
 Phe Val Val Tyr Val Asn Gly Asp Glu Ala Ser Leu Ala Tyr Val Val
 180 185 190
 Asn Leu Asn Phe Leu Thr Pro Glu Pro Gly Asn Trp Leu Tyr Ile Ile
 195 200 205
 Asp Ala Val Asp Gly Lys Ile Leu Asn Lys Phe Asn Gln Leu Asp Ala
 210 215 220
 Ala Lys Pro Gly Asp Val Lys Ser Ile Thr Gly Thr Ser Thr Val Gly
 225 230 235 240
 Val Gly Arg Gly Val Leu Gly Asp Gln Lys Asn Ile Asn Thr Thr Tyr
 245 250 255
 Ser Thr Tyr Tyr Tyr Leu Gln Asp Asn Thr Arg Gly Asn Gly Ile Phe
 260 265 270
 Thr Tyr Asp Ala Lys Tyr Arg Thr Thr Leu Pro Gly Ser Leu Trp Ala
 275 280 285
 Asp Ala Asp Asn Gln Phe Phe Ala Ser Tyr Asp Ala Pro Ala Val Asp
 290 295 300
 Ala His Tyr Tyr Ala Gly Val Thr Tyr Asp Tyr Tyr Lys Asn Val His
 305 310 315 320
 Asn Arg Leu Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Ala Ala Ile Arg Ser Ser Val
 325 330 335
 His Tyr Ser Gln Gly Tyr Asn Asn Ala Phe Trp Asn Gly Ser Gln Met
 340 345 350
 Val Tyr Gly Asp Gly Asp Gly Gln Thr Phe Ile Pro Leu Ser Gly Gly

355 360 365
 Ile Asp Val Val Ala His Glu Leu Thr His Ala Val Thr Asp Tyr Thr
 370 375 380
 Ala Gly Leu Ile Tyr Gln Asn Glu Ser Gly Ala Ile Asn Glu Ala Ile

 385 390 395 400
 Ser Asp Ile Phe Gly Thr Leu Val Glu Phe Tyr Ala Asn Lys Asn Pro
 405 410 415
 Asp Trp Glu Ile Gly Glu Asp Val Tyr Thr Pro Gly Ile Ser Gly Asp
 420 425 430
 Ser Leu Arg Ser Met Ser Asp Pro Ala Lys Tyr Gly Asp Pro Asp His
 435 440 445
 Tyr Ser Lys Arg Tyr Thr Gly Thr Gln Asp Asn Gly Gly Val His Ile

 450 455 460
 Asn Ser Gly Ile Ile Asn Lys Ala Ala Tyr Leu Ile Ser Gln Gly Gly
 465 470 475 480
 Thr His Tyr Gly Val Ser Val Val Gly Ile Gly Arg Asp Lys Leu Gly
 485 490 495
 Lys Ile Phe Tyr Arg Ala Leu Thr Gln Tyr Leu Thr Pro Thr Ser Asn
 500 505 510
 Phe Ser Gln Leu Arg Ala Ala Val Gln Ser Ala Thr Asp Leu Tyr

 515 520 525
 Gly Ser Thr Ser Gln Glu Val Ala Ser Val Lys Gln Ala Phe Asp Ala
 530 535 540
 Val Gly Val Lys
 545
 <210> 5
 <211> 548
 <212> PRT
 <213> Geobacillus caldoproteolyticus
 <220><221> misc_feature
 <223> Full-length amino acid sequence of the thermolysin from
 Geobacillus caldoproteolyticus

<400> 5

Met Lys Met Lys Met Lys Leu Ala Ser Phe Gly Leu Ala Ala Gly Leu

1 5 10 15

Ala Ala Gln Val Phe Leu Pro Tyr Asn Ala Leu Ala Ser Thr Glu His

20 25 30

Val Thr Trp Asn Gln Gln Phe Gln Thr Pro Gln Phe Ile Ser Gly Asp

35 40 45

Leu Leu Lys Val Asn Gly Thr Ser Pro Glu Glu Leu Val Tyr Gln Tyr

50 55 60

Val Glu Lys Asn Glu Asn Lys Phe Lys Phe His Glu Asn Ala Lys Asp

65 70 75 80

Thr Leu Gln Leu Lys Glu Lys Asn Asp Asn Leu Gly Phe Thr Phe

85 90 95

Met Arg Phe Gln Gln Thr Tyr Lys Gly Ile Pro Val Phe Gly Ala Val

100 105 110

Val Thr Ala His Val Lys Asp Gly Thr Leu Thr Ala Leu Ser Gly Thr

115 120 125

Leu Ile Pro Asn Leu Asp Thr Lys Gly Ser Leu Lys Ser Gly Lys Lys

130 135 140

Leu Ser Glu Lys Gln Ala Arg Asp Ile Ala Glu Lys Asp Leu Val Ala

145 150 155 160

Asn Val Thr Lys Glu Val Pro Glu Tyr Glu Gln Gly Lys Asp Thr Glu

165 170 175

Phe Val Val Tyr Val Asn Gly Asp Glu Ala Ser Leu Ala Tyr Val Val

180 185 190

Asn Leu Asn Phe Leu Thr Pro Glu Pro Gly Asn Trp Leu Tyr Ile Ile

195 200 205

Asp Ala Val Asp Gly Lys Ile Leu Asn Lys Phe Asn Gln Leu Asp Ala

210 215 220

Ala Lys Pro Gly Asp Val Lys Ser Ile Thr Gly Thr Ser Thr Val Gly

225 230 235 240

Val Gly Arg Gly Val Leu Gly Asp Gln Lys Asn Ile Asn Thr Thr Tyr
 245 250 255
 Ser Thr Tyr Tyr Tyr Leu Gln Asp Asn Thr Arg Gly Asn Gly Ile Phe
 260 265 270
 Thr Tyr Asp Ala Lys Tyr Arg Thr Thr Leu Pro Gly Ser Leu Trp Ala
 275 280 285
 Asp Ala Asp Asn Gln Phe Phe Ala Ser Tyr Asp Ala Pro Ala Val Asp
 290 295 300
 Ala His Tyr Tyr Ala Gly Val Thr Tyr Asp Tyr Tyr Lys Asn Val His
 305 310 315 320
 Asn Arg Leu Ser Tyr Asp Gly Asn Asn Ala Ala Ile Arg Ser Ser Val
 325 330 335
 His Tyr Ser Gln Gly Tyr Asn Asn Ala Phe Trp Asn Gly Ser Gln Met
 340 345 350
 Val Tyr Gly Asp Gly Asp Gly Gln Thr Phe Ile Pro Leu Ser Gly Gly
 355 360 365
 Ile Asp Val Val Ala His Glu Leu Thr His Ala Val Thr Asp Tyr Thr
 370 375 380
 Ala Gly Leu Ile Tyr Gln Asn Glu Ser Gly Ala Ile Asn Glu Ala Ile
 385 390 395 400
 Ser Asp Ile Phe Gly Thr Leu Val Glu Phe Tyr Ala Asn Lys Asn Pro
 405 410 415
 Asp Trp Glu Ile Gly Glu Asp Val Tyr Thr Pro Gly Ile Ser Gly Asp
 420 425 430
 Ser Leu Arg Ser Met Ser Asp Pro Ala Lys Tyr Gly Asp Pro Asp His
 435 440 445
 Tyr Ser Lys Arg Tyr Thr Gly Thr Gln Asp Asn Gly Gly Val His Ile
 450 455 460
 Asn Ser Gly Ile Ile Asn Lys Ala Ala Tyr Leu Ile Ser Gln Gly Gly
 465 470 475 480
 Thr His Tyr Gly Val Ser Val Val Gly Ile Gly Arg Asp Lys Leu Gly

485 490 495
Lys Ile Phe Tyr Arg Ala Leu Thr Gln Tyr Leu Thr Pro Thr Ser Asn
500 505 510
Phe Ser Gln Leu Arg Ala Ala Ala Val Gln Ser Ala Thr Asp Leu Tyr

515 520 525
Gly Ser Thr Ser Gln Glu Val Ala Ser Val Lys Gln Ala Phe Asp Ala
530 535 540
Val Gly Val Lys
545